

血管構造を備えた立体的な肝組織の構築

著者	大? 達哉
発行年	2016
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2015
報告番号	12102甲第7656号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00143774

血管構造を備えた立体的な肝組織の構築

大 崎 達 哉

2016 年 2 月

筑波大学大学院博士課程

数理物質科学研究科博士論文

博士(工学)

血管構造を備えた立体的な肝組織の構築

大 崎 達 哉

ナノサイエンス・ナノテクノロジー 専攻

目次

第一章	1
序論	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 移植治療の限界と再生医療	1
1.1.2 組織工学 (Tissue engineering)	2
1.1.3 幹細胞と分化	3
1.1.4 ES 細胞	4
1.1.5 iPS 細胞	4
1.1.6 足場材料(scaffold)を利用した組織構築	5
1.1.7 細胞組織体の構築と回収	8
1.1.8 既往の細胞回収法	9
1.1.9 肝臓の機能と構造	11
1.1.10 生体外で三次元組織を作製すること	12
1.1.11 細胞の呼吸とエネルギー産生	13
1.1.12 三次元組織の培養における酸素濃度	14
1.1.13 作製中の溶存酸素量と虚血再灌流によるダメージ	16
1.1.14 作製後の組織の自己組織化、組織のサイズと細胞数	16
1.1.15 血管新生と既往の血管作製法	16
1.1.16 ミクロな血管構造作製法(血管新生) in vitro or in vivo prevascularization	19
1.1.17 マクロな血管構造作製法	21
1.2 研究背景のまとめと現状での問題点	25
1.3 本研究の目的	27
1.4 本論文の構成	27
第 1 章 序論 研究背景	27
第 2 章 電気化学的原理に基づいた血管構造の作製	27
第 3 章 細胞の自己組織能を利用した微小血管構造の誘導	27
第 4 章 iPS 由来肝細胞を用いた 3D 肝臓組織の構築	28
第 5 章 腹腔内留置を目的としたデバイスの開発とカニューレーションを利用した肝組織の移植	28
第 6 章 結論	28
1.4 参考文献	29
第二章	32
電気化学的原理に基づいた血管構造の作製	32
2.1 はじめに	32

2.2. 電気化学を用いた細胞脱離と細胞転写法	32
2.2.1 本節の目的.....	32
2.2.2 細胞の回収法	32
2.2.3 電気化学還元脱離を用いた細胞脱離.....	35
2.3 オリゴペプチドのデザイン	36
2.3.1 本節の目的.....	36
2.3.2 SAM の形成	36
2.3.3 自己組織化配列	37
2.3.4 RGD 配列	37
2.3.5 設計したオリゴペプチドの配列	37
2.3.6 サイクリックボルタンメトリー	38
2.3.7 水晶振動子マイクロバランス法.....	39
2.3.8 試薬及び装置.....	40
2.3.9 実験手順	41
2.3.10 実験結果と考察	43
2.3.11 本節のまとめ	44
.....	45
.....	46
2.4 光架橋性のゼラチンゲル.....	47
2.4.1 本節の目的.....	48
2.4.2 細胞外マトリックス(ECM)	48
2.4.3 実験装置及び試薬.....	49
2.4.4 実験手順	50
2.4.5 実験結果と考察	51
2.4.6 本節のまとめ	51
2.5 光架橋性のゼラチンゲルを用いた血管構造の構築.....	54
2.5.1 本節の目的.....	55
2.5.2 実験装置及び試薬.....	56
2.5.3 実験手順	57
2.5.4 実験結果と考察	59
2.5.5 本節のまとめ	59
2.6 送液培養において送液速度が血管内皮細胞に与える影響.....	62
2.6.1 血液循環	62
2.6.2 送液培養と静置培養	62
2.6.3 送液速度と細胞への養分供給.....	62

2.6.4 本節の目的.....	63
2.6.5 試薬及び装置.....	63
2.6.6 実験手順.....	64
2.6.7 実験結果と考察.....	64
2.6.8 本節のまとめ.....	64
2.7 送液速度に血管内皮細胞の配向性.....	66
2.7.1 本節の目的.....	66
2.7.2 細胞の配向性.....	66
2.7.3 高速フーリエ変換による画像解析.....	66
2.7.4 試薬および装置.....	66
2.7.5 実験方法.....	67
2.7.6 実験結果と考察.....	68
2.7.7 本節のまとめ.....	68
2.8 電気化学細胞転写によるギャップジャンクションの変化.....	71
2.8.1 本節の目的.....	71
2.8.2 細胞間接着.....	71
2.8.3 光褪色後蛍光回復法 FRAP.....	73
2.8.4 試薬および装置.....	73
2.8.5 実験方法.....	74
2.8.6 実験結果と考察.....	75
2.8.7 本節のまとめ.....	75
2.9 電気化学細胞転写によるタイトジャンクションの変化.....	76
2.9.1 本節の目的.....	77
2.9.1 タイトジャンクション測定方法.....	77
2.9.4 試薬および装置.....	77
2.9.5 実験方法 1—蛍光染色を用いた方法—.....	78
2.9.6 実験方法 2—デキストランを用いた血管透過性の評価—.....	79
2.9.7 実験結果と考察.....	79
2.9.8 本節のまとめ.....	79
2.10 電気化学細胞転写法による細胞極性の変化.....	82
2.9.1 本節の目的.....	82
2.9.2 細胞極性.....	82
2.9.3 ICAM-1.....	82
2.9.4 試薬及び装置.....	82
2.9.5 実験方法.....	83

2.9.6 実験結果と考察	85
2.9.7 本節のまとめ	85
2.11 本章のまとめ	87
2.12 参考文献	88
第三章	90
細胞の自己組織能を利用した微小血管構造の誘導	90
3.1 はじめに	90
3.2 血管内皮細胞の血管ネットワーク形成	91
3.2.1 血管内皮細胞の自己組織的な血管構造形成	91
3.2.2 Tubulogenesis	91
3.2.3 本節の目的	92
3.2.4 実験手順	92
3.2.5 実験結果と考察	92
3.3 微小血管構造の管腔構造と蛍光ビーズ送液	96
3.3.1 本節の目的	96
3.3.2 血管内皮細胞の自己組織的な血管構造形成	96
3.3.3 実験手順	97
3.3.4 実験結果と考察	98
.....	100
3.3.5 実験手順 2 蛍光ビーズ送液	103
3.3.6 実験結果と考察	104
3.4 送液可能で分岐構造を備えた血管構造の作製	106
3.4.1 本節の目的	106
3.4.2 実験手順	106
3.4.3 実験結果と考察	108
3.4.4 本節のまとめ	108
3.5 本章のまとめ	113
3.6 参考文献	114
第四章	115
iPS 細胞由来肝細胞を用いた 3D 肝組織の構築	115
4.1 はじめに	115
4.2 肝スフェロイドの形成手法	115
4.2.1 はじめに	115
4.2.2 本節の目的	115
4.2.3 スフェロイド	115

4.2.4 実験手順	116
4.2.5 実験結果と考察	118
4.2.6 本節のまとめ	119
4.3 ヒト肝癌細胞、ヒト初代肝細胞を用いた肝臓類似組織の形成.....	123
4.3.1 はじめに	123
4.3.2 肝臓の発生過程を模倣した肝臓組織構築	123
4.3.3 本節の目的.....	124
4.3.4 実験手順	124
4.3.5 実験結果と考察	127
4.3.6 本節のまとめ	128
4.4 ヒト iPS 細胞を用いた 3D 肝臓類似組織の形成	133
4.4.1 はじめに	133
4.4.2 iPS 細胞から成熟肝細胞への分化.....	133
4.4.3 実験手順	135
4.4.4 実験結果と考察	141
.....	144
4.5 本章のまとめ.....	154
4.6 参考文献.....	155
第五章.....	156
腹腔内留置を目的としたデバイスの開発と肝組織の移植	156
5.1 はじめに.....	156
5.2 血管吻合のためのデバイス開発.....	157
5.2.1 はじめ	157
5.2.2 本節の目的.....	157
5.2.3 素材の選定.....	157
5.2.4 生体内の血圧	158
5.2.5 チャンバーサイズ.....	158
5.2.6 実験手順	158
5.2.7 実験結果と考察	160
5.3 クラニアルウィンドウによる肝組織の移植.....	163
5.3.1 はじめに	163
5.3.2 クラニアルウィンドウ	163
5.3.3 実験手順	164
5.3.4 実験結果と考察	165
5.4 カニュレーションによる肝組織の移植と体外循環培養	170

5.4.1 はじめに	170
5.4.2 カニキュレーション	170
5.4.3 本節の目的.....	171
5.4.4 実験手順	171
5.4.5 実験結果と考察	174
5.5 マウス肝細胞の抽出.....	181
5.5.1 はじめに	181
5.5.2 本節の目的.....	181
5.5.3 実験手順	181
5.5.4 実験結果と考察	184
5.6 肝組織の腹膜内留置.....	187
5.6.1 はじめに	187
5.6.2 本節の目的.....	187
5.6.3 実験手順	187
5.6.4 実験結果と考察	188
5.7 本章のまとめ.....	192
5.8 参考文献.....	193
第六章	194
結論.....	194
6.1 本研究の結論.....	194
謝 辞.....	196

第一章

序論

1.1 研究背景

1.1.1 移植治療の限界と再生医療

移植以外に救命できない重篤な臓器・組織不全患者に対する治療法として、臓器移植や人工臓器を用いた治療が行われている。移植治療は、末期臓器不全の治療の切り札となる治療法であったが、慢性的なドナー不足により、臓器の入手は非常に困難となっている。臓器移植法の改訂や積極的な呼びかけによって臓器提供の意思がある人の割合は年々増加しているが、臓器を待つ人に比べて圧倒的にドナーの数が少ないと言った問題点がある(Fig. 1.1) [1] [2]。この問題は、たとえ全国民が、臓器の提供意思があったとしても、移植を待つ人々の数を上回る事はないので根本的な解決策は存在せず、移植医療のボトルネックとなっている。特に日本では、移植に関する法律の整備が整ってきた段階であり、移植治療では後進国であり、ドナー不足の問題が顕著に現れている。例えば、肝臓に特化すると、肝移植希望者は 400 人程にも関わらず、その年に治療された移植数はわずか 40 であり、約 10 人

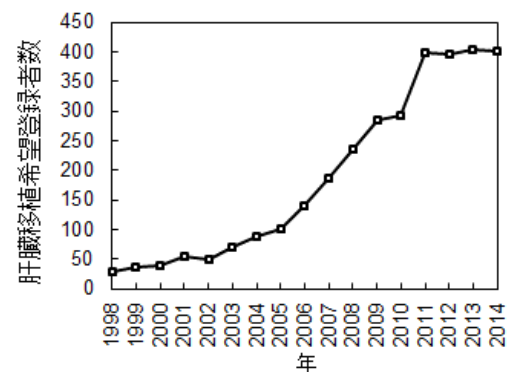


Figure 1.1 上:肝臓移植[1], 下:肝臓移植登録者数 (日本)

に 1 人しか、治療を実施できていない[3]。一方、移植治療が最も盛んに行われているアメリカでさえも、この問題は解決されていない。例えば、現在、アメリカで心臓移植のドナーを待つ患者は、5 万人以上いるが一方で年間に心臓移植は 3000 件程度しか行われていない。また移植治療の問題点としては他にも、拒絶反応や免疫抑制などの問題点がある。移植治療では、他人の臓器を使用するため、自分の体内に異物が入ってきたという状況と同じ状況になると考えられる。もちろん移植前に、赤血球や白血球の型が一致した人がドナーとして選ばれるが、これらの型が完璧に一致した人がドナーとして現れる確率は非常に低い。そのため、ある程度妥協してドナーを選定する必要がある。そのため、移植後に体が移植した臓器を攻撃する拒絶反応や、逆に移植した臓器がホストを攻撃する移植片対宿主病(GVHD)が起こりうる。この反応を押さえるために、移植した後も患者は、半永久的に自己の免疫を押さえる免疫抑制剤を飲み続けなければならないため患者の QOL (Quality of Life)の低下に繋がりこれも移植治

療の問題点であると言える。

移植を待つ間、人工肝補助療法と呼ばれる方法で患者を延命している。これらは、血液濾過透析や血漿交換によって血液を浄化する方法である。しかしこれらの方法は、大量の血液を体外へとバイパスさせ循環させる必要があるため、体への負担が大きい、あくまでも移植を待つ間の補助的な方法である。このような状況の下で、これらを代替するような新たな治療法として「再生医療」と呼ばれる治療が注目されている。再生医療とは、「失った組織、臓器を補うために、人間に潜在的に備わっている再生能力を活用し治療を目指す医療」と定義されている[4]。生体には元々、傷を直すための再生能力が備わっている。たとえば、けがをして皮膚が切れて血が

出れば、すぐに瘡蓋ができて、1週間ほどで傷は完全に塞がり、一ヶ月もすれば傷跡も消える。また骨折をした場合でも、再生能力により1、2ヶ月もすれば骨が繋がり元通りとなる。このように、ヒトの体は局所的、恒常的に再生と死を繰り返している。例えば、2週間という間隔で皮膚の細胞は再生と死を繰り返しており、骨ならば、5年から10年で入れ替わってしまう。このように、人間の持つ再生能力は優秀で且つ非常に強力である。しかしながら、この再生能力にも限界がある。ヒトは腕や脚を切断しても、イモリやヤモリの様に新たに生えてくる事はなく、一度機能を失ったら二度と元に戻らない臓器もある。この再生能力は、年を取るにつれて低下してゆく。この人間の持つ再生能力を何らかの形（主に細胞そのものや細胞が放出する各種シグナルや増殖因子）で高め、失った臓器や組織を再生しようと言う取り組みこそが再生医療である(**Fig. 1.2**)。この手法では、臓器移植のようにドナーを待つ必要もなく、自己の細胞を使用すれば拒絶反応をなくすことも可能である。このように、患者を救命するだけではなく、失われた組織や臓器を再生し国民の健康を維持する技術が世界中で望まれている。再生医療のアプローチは様々であるが、中でも近年、自己の細胞を用いて、生体外で細胞組織を構築してそれを移植する組織工学(**Tissue Engineering**)的な治療法が注目されている。

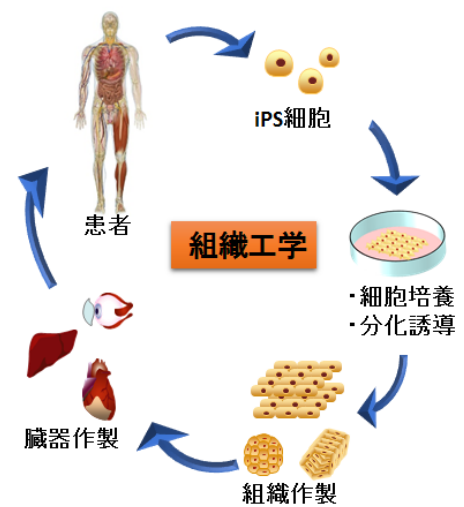


Figure 1.2 再生医療の模式図

1.1.2 組織工学 (Tissue engineering)

組織工学という概念は、1993年にMITのLangerとVacantiらによって提唱された手法であり、再生医療を支える考え方である[5]。この概念では人の再生能力を誘発させるために細胞そのものを利用する。最も顕著な成功例は、造血幹細胞移植である。これは、正常な血液を作ることができなくなった患者に対して、適合するドナーの造血幹細胞を直接注入することで、患者が正常な血液を生産できるようにする方法である。しかし、造血幹細胞移植のように、単に細胞を直接体に移植しただけでは解決できない場合がある。それは特に、移植した細胞が元々の環境とはかけ離れている場合である。細胞は、生体内で他の細胞や細胞外マトリックスに接着した状態で存在しており、その結合自体が、生体の

様々なシグナル伝達や機能維持に関わっているため、単に細胞を移植しただけでは本来の機能を発揮できない。つまり、生体内へ単に細胞をインジェクションするだけでは生着率が低く、「細胞」をそのまま利用する方法には医療技術としての限界があることが分かっている。また、構造的な配置が意味をなす場合にも細胞移植を適用することはできない。肝臓や腎臓、肺などの組織は、細胞の活性も重要だが、それ以上にその複雑な構造が重要であり、それ自体が、臓器としての機能や活性を保っているため、細胞移植によって細胞を注入しただけでは、臓器の再生能力を高める事はできない。

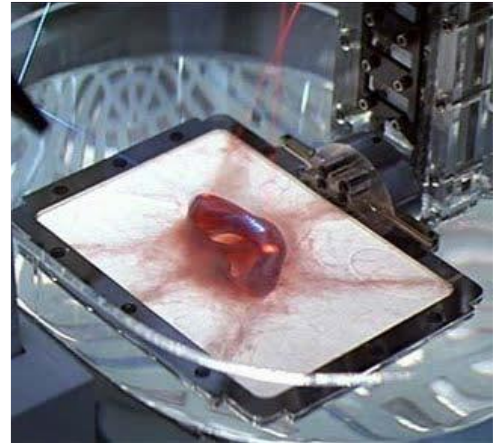


Figure 1.3 組織工学的手法によって再生される臓器「映画 Face/off」

そこで、予め、細胞を用いて生体外で組織を形作り、再構築した後に移植するアプローチが提唱された(**Fig. 1.3**)。この治療法は、実質細胞を組織に注入する細胞移植療法と比較すると、組織への生着率が良く、造血幹細胞や軟骨など、一部の組織については高い治療効果が得られることが既に実証されている。このような実績から、再生医療と組織工学のアプローチは非常に注目され、移植治療に変わる治療法の最有力候補にある。2012 年、文部科学省は、10 年以内に立体的な臓器を作製することを新たに目標においた。

(http://www.nikkei.com/article/DGXNASDG0201Q_S2A101C1CR0000/)。

組織工学的手法において、治療は以下の4つのステップに分けられる。

- 1.患者さんから元となる細胞の採取
- 2.採取した細胞の培養と目的細胞への分化
- 3.工学的手法による目的細胞を用いた組織作製
- 4.組織片の移植

特に3の工学的手法による目的細胞を用いた組織作製では、医学分野だけでは、実現が困難であった研究領域であるが、工学的な技術との複合領域において急速に進歩しつつある。

1.1.3 幹細胞と分化

上記の4つのステップうち、採取した細胞の培養と目的細胞への分化も組織工学を支える重要な研究分野であり、古くから研究が行われてきた。重要なキーワードとなるのは、幹細胞と分化制御である。幹細胞とは、複数の細胞に分化できる能力（多分化能）と細胞分裂を経ても分裂能を維持できる（自己複製能）を併せ持つ能力と定義されている[6]。ヒトの発生は、精子と卵子が合体した受精卵という一つの全能性の幹細胞から始まる。この細胞は、すべての細胞へ変化（分化）する能力を持っており、同時に次々と自己を複製し増殖していく。ヒトはこの受精卵から、徐々に分化能と分裂能を失いな

がら分化して、それぞれの細胞（例えば、皮膚の細胞、肝臓の細胞、骨の細胞など）へ変化し最終的に 60-70 兆個の細胞へと分化、増殖する。再生医療分野への応用を考えた時、幹細胞は、すべての細胞へ分化増殖するという性質故に非常に魅力的な細胞であり、近年このような幹細胞を作り出す技術、生体の臓器内に存在する幹細胞を取り出す技術、これらの細胞から目的とする臓器細胞へ分化誘導する研究が活発に進められている。

1.1.4 ES 細胞

このように、幹細胞への注目が高まる一方で、ヒトの体から幹細胞を採取できる数は限られており、かつ全能性を持った細胞は存在していない。そこで、人工的に全能性または多能性を持った幹細胞を作製する研究が行われてきた。2004 年にシカゴ生殖遺伝学研究所のユーリー・バーリンスキーらが世界で初めてマウスの受精卵である桑実胚の段階から Embryonic stem (ES)細胞を樹立することに世界で初めて成功している[7]。また 2006 年には Lonza らがヒトの ES 細胞の樹立に成功している。[8]。この ES 細胞は、理論上すべての細胞に分化、増殖する能力を持っており一躍注目を浴びた。しかしながら、様々な問題点が露呈してきている。一番の問題は、ヒト胚の一部から作製するという作製方法にある。この胚は、ヒトへと成長する生命の起源であり、これを使用する事は、一つの生命を閉ざしてしまうのではないかという倫理的な問題が表面化してきた。また、実際に再生医療へと応用し、ヒトへ移植するとなると、拒絶反応が発生する。ES 細胞は、他者の細胞を使用しなければならず染色体変異や遺伝子異常が生じ、それが蓄積していく事が明らかとなっており、医療への応用は樹立後間もない株に限られる。また遺伝子異常の結果、細胞自体が癌化する可能性も指摘されている。

1.1.5 iPS 細胞.

ES 細胞の倫理的な問題を受けて、ヒトの受精卵を使わずに人工的に幹細胞を作製する方法が求められた。その中で、2008 年、京都大学の山中らは、マウスの皮膚細胞に Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc という 4 つの遺伝子を組み込む事で細胞の初期化に成功し、人工多能性幹細胞を作製し、induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)と命名した[9]。この細胞は、ES 細胞の様に全能性を持ち、無限増殖能を持っている幹細胞である。山中らは続けてヒトの細胞を使つての iPS 細胞の樹立に成功し、再生医療への応用に向けてその可能性が広がった。この iPS 細胞作製に用いた遺伝子は、後に山中 4 因子と呼ばれる事となる。iPS 細胞の作製によって、拒絶反応を起こさない自身の細胞を目的の機能細胞へ分化させ大量に樹立する事が可能となったため、再生医療実現に向け 2. 「採取した細胞の培養と目的細胞への分化」のステップは飛躍的に進歩した。

2015 年現在、iPS 細胞からは外胚葉、中胚葉、内胚葉、間葉系などほぼすべての細胞へ分化する事が示されている[10]。この功績を讃えられ、山中伸哉教授は 2012 年ノーベル賞を、発見からわずか 6 年という異例の早さで受賞した。

1.1.6 足場材料(scaffold)を利用した組織構築

これらの細胞（幹細胞や分化細胞）を使って 3 の「工学的手法による目的細胞を用いた組織作製」に向けた研究も盛んに行われている。生体外で 2 次元または 3 次元の組織を再構築するために、細胞のみで形成する方法と、その組織の形状に加工された足場材料(scaffold)と細胞を組み合わせる手法がある。Vacanti, Langer らは、動物の軟骨細胞を生体吸収性の人工合成 ポリマー(PGA、PLA など)からなる scaffold に播種して、一定の期間培養した後、ヌードマウス背部に移植して、ヒトの耳の形状をした軟骨組織を再生した[11] (Fig. 1.4)。以下に主な組織 再生の研究例を示す。



Figure 1.4 足場材料を用いた耳マウス[11]

皮膚の再生

皮膚の再生と置換を目指した培養皮膚は、世界ではじめて実用化された組織であり、現在は日本を含めて世界中で実用化された組織である。皮膚は再生能力も高く、厚みのない組織であるため、培養中に栄養や酸素交換が阻害されて組織の中央部が壊死してしまうなどの問題は生じにくいため、組織学的に簡単な組織である。細胞には、培養された患者自身の表皮を患者に移植するかあるいは、広範囲の熱傷などの緊急性を要する場合には、自分の皮膚ではなく、他人の皮膚を培養して作製した表皮を使用し、後に自分の皮膚組織が再生し自然と置き換わるという方法がとられている。

これらの手法は、実験的に優れた成果を上げており、製品化も進んでいる。日本ではジャパンティッシュエンジニアリング (J-TEC) が培養皮膚を販売している。このように、皮膚の再生医療は、技術および材料ともかなりのレベルで進んでいる。しかし、この培養皮膚には汗腺や脂腺、毛嚢などの付属器官は含まれておらず、さらなる皮膚の再生技術と再生足場材料の研究開発が必要である。特に皮膚の場合は機能的のみならず綺麗に再生されることが望まれる。皮膚組織の市場規模は、重症熱傷なども含めると 2020 年には 285 億円に達すると見込まれている[12]。



Figure 1.5 自家培養皮表皮ジェイス® from J-TEC

軟骨の再生

軟骨は軟骨細胞と細胞外基質からなり、細胞同士はお互いに接することなく存在している。成人の軟骨内には血管が無く、水分が 80%含まれている。そのため、軟骨細胞は軟骨膜を通して関節液から栄養成分や酸素を得て呼吸を行っている。一方で、半月板や椎間板などの組織自体は再生能があり、損傷を受けても徐々に修復される。しかし、それ以外の軟骨は修復されないため、その形を成形する外科的な修復が必要である。特に、関節軟骨は関節におけるショックアブソーバーと関節の運動機能を担い、患者の QOL 低下に直結している。

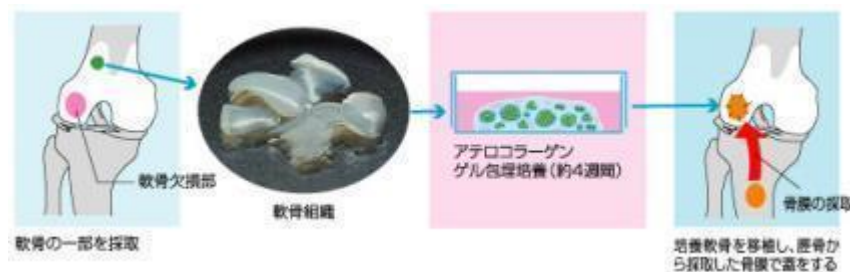


Figure 1.6 軟骨移植プロセス

一方で、患者の軟骨からごく少量の軟骨組織を採取し、そこから軟骨細胞を分離し、細胞を培養して増殖させ、軟骨細胞の浮遊液を患者自身の骨膜で覆った軟骨欠損部に移植する方法が見出された (Fig. 1.6)。この手法は、比較的容易に手術ができるが、増殖した細胞の軟骨細胞としての機能低下や軟骨組織の採集によって、患者自身の軟骨に欠損を作ることが問題となっていた。これらの再生軟骨の問題点を解決するために、軟骨細胞ではなく、未分化細胞である骨髄間葉系細胞を用い、これを十分に増殖させた後に軟骨細胞に分化させる方法が注目を集めている。

これらの、軟骨細胞あるいは骨髄間葉系細胞を足場材料中で増殖させ、適切な成長因子や力学刺激を加え軟骨基質を持った軟骨組織として再生させる手法が主流である。骨髄間葉細胞は一定の力学的な刺激により、その分化方向が制御できることが報告されている。

日本では変形性関節症の患者数が 50～60 万人であり、市場規模は約 600 億円と試算される。

角膜の再生

皮膚や軟骨と並んで、研究が広く進められ臨床試験を通過した実用例に角膜がある。角膜は、目を構成する層状の組織であり、透明な組織である。視覚出物を捉える際に光を屈折させ水晶体とともに目にピントを合わせる効果がある。角膜表面は常に涙で覆われていて、感想と眼球内部への細菌感染を防いでいる。角膜が傷つきアレルギー反応が原因で炎症を起こすと、角膜炎になる。

既に海外で多くの実施例がありかつ商業化されているが、2012年、日本でもジャパンティッシュエンジニアリングから、自家培養角膜上皮が商品化されている(**Fig. 1.7**)。

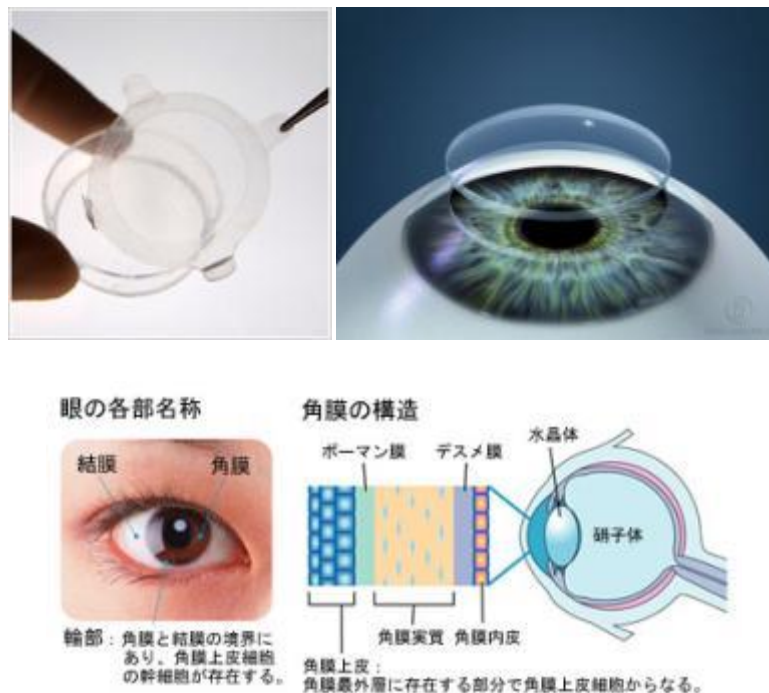


Figure 1.7 上: 自家培養角膜 下: 角膜の構造(J-TEC 治験ホームページ)

<http://www.nidek.co.jp/news/2014/20141014.html>

肝臓の再生

前述した皮膚、角膜、軟骨などの組織に対して、脾臓や肝臓は組織に細胞外基質が少ない代わりに、細胞密度が非常に高く、機能発現にはこれらの細胞同士の相互作用が皮膚、軟骨、骨に比べて重要である。しかし、組織構造が複雑であり、これらの構造を模倣し、工学的な手法を用いての作製はより困難である。現状では肝臓そのものを、臓器として再生することは非常に難しいため、その機能の最小単位を再生し、それ移植することで肝臓の機能を代替するという考え方が主流である。

肝臓を再生する試みで盛んに研究が進められているのは、細胞凝集塊、スフェロイドの形成である。スフェロイドは、細胞非接着性の底面が半球状の培養プレートに細胞を播種することによって作製されている。また、細胞の接着性を制御した培養皿で大量のスフェロイドを形成するという試みも数多くなされており、これらは特殊な培養技術や装置を必要としない技術として注目を集めている。スフェロイドの作製技術は、既に確立されている一方で、肝臓においてはその細胞のソースが問題である。大抵の場合、患者さんの肝細胞は使えないため、自分の幹細胞から肝細胞を分化させるか、あるいは他人の細胞を増やして利用するしかない。後者では、移植後に免疫反応が起きるため、免疫隔離のための材料開発が必要となるが、免疫を隔離しつつ必要な物質は透過させなければならない点が難しい。

1.1.7 細胞組織体の構築と回収

生体外で移植できる組織を再構築するために scaffold を利用した方法を挙げたが、上述のように限られた組織に限定されているのが現状である。例えば、組織の透明性が不可欠な角膜組織や強い収縮性を要する心筋組織、また、細胞自体の特殊な肝機能が重要となる肝組織など、細胞そのものの機能や特性が重要となる多くの臓器・組織を再生するには、生体の組織構造を模倣した高密度な細胞からなる組織体を構築する技術が必要となる。これらは、生体足場材料を用いて構築することは困難であるため、革新的技術が求められている。その有効なプロセスとして、様々な形状、細胞種の組織パーツを形成し、組み合わせることで三次元組織を構築する手法がある。この手法を実現するためには、まず、細胞組織を構築する技術と作製した組織を基板から回収する技術が必要となる。さらには、組織に酸素・栄養素の供給が行き届くような血管様構造をいかにして導入するかが最重要課題のひとつに挙げられる。

東京女子医科大学の岡野教授らは、シート状の細胞組織を構築し、これらを積層化させることによって目的組織を形成する「細胞シート工学」を提唱している[13]。彼らは、これを組織や臓器の基本構成単位と捉えている。また、形成した細胞シートを利用して、1. 単層シート移植（皮膚、角膜上皮）、2. 同一細胞シートの積層化による組織構築（心筋）、3. 数種の細胞シートの積層化による層状構造を呈する組織構築（肝臓、血管、膀胱）を積極的に行っている。この手法では、数種の細胞シートを積層する際に、血管内皮前駆細胞や血管内皮細胞のシートを導入すれば、形成した細胞組織内に血管構造が形成されることがわかっており、厚みのある組織を形成できる可能性が示唆されている。

1.1.8 既往の細胞回収法

既往の細胞回収法について以下に述べる。

酵素処理法

細胞培養において、ディッシュ上に接着した様々な細胞を回収する際には、トリプシンやコラゲナーゼなどのタンパク質分解酵素が用いられている。エンドペプチダーゼであるトリプシンは塩基性アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解し切断する作用がある。この酵素の作用により、細胞－培養基板間の接着分子や、タンパク質を分解することによって、単離した細胞が回収できる。しかし、これらの酵素は細胞－基板間の結合だけではなく、細胞間の結合も分解してしまうため、細胞同士が互いに結合した組織の回収には適していない。

温度応答性ポリマーを利用した手法

東京女子医科大学の岡野教授らは、細胞シートを、細胞間の結合を保ったまま剥離するために温度応答性ポリマー (pNIPAM) と呼ばれる特殊なポリマーを培養表面に修飾し、それを実現している[13][14]。温度応答性ポリマーは、32℃より高温側では疎水性、低温側では親水性を示すため、このポリマー表面上で培養した細胞や組織は温度を下げると細胞の接着性が弱まり、自発的に培養皿から剥離する。彼らは主に角膜組織、心筋組織などをターゲットとしているが、角膜移植については既に臨床応用試験が始まっている段階である (Fig. 1.8)。また、セルシードは、温度応答性ポリマー (PIPAAm) を器材表面に固定化した細胞シート回収用培養皿 UpCell を販売している。この手法は大変効果的ではあるものの、培養期間を通して温度管理をする必要があり、また、組織を剥離させるのに 30~70 分の時間を要してしまうなどの問題がある。

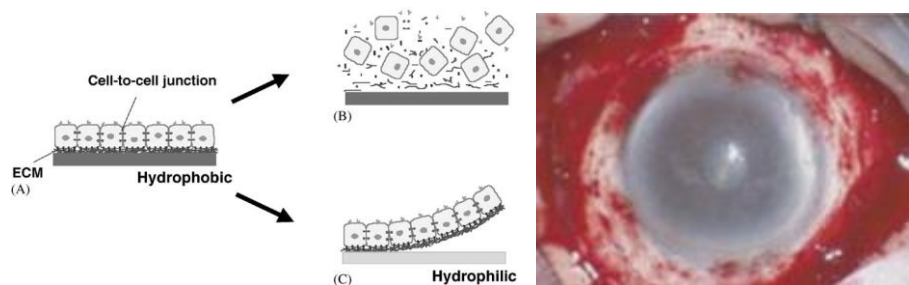


Figure 1.8 温度応答性ポリマーを利用した細胞シートの回収（左）および角膜移植（右）[13]

機能性磁気ナノ粒子を利用した手法

九州大学の井藤らは、磁性ナノ粒子を用いて組織構造を構築する技術を開発している[15]。これは、磁性ナノ粒子であるマグネタイトを細胞内に取り込ませることによって細胞を磁気標識し、磁石を目的の位置に設置し、磁力で細胞を任意の場所に配置・接着させて、細胞を高密度に集積させる手法である。また、細胞非接着性の培養表面上に磁石の引力によって細胞を固定させているため、組織を構築した後に磁石を除くことで容易に回収可能である。この技術を用いて井藤らは、異種の細胞シートとの共培養や血管を模倣した管状構造の構築を報告している[16]。しかしながら、この手法では、かなり多量の磁気ナノ粒子を細胞に取り込ませる必要があり、細胞への悪影響が生じてしまうことが懸念され

る。また、磁気によって半ば強引に培養表面に固定しており、実際は表面に接着していないため、接着性細胞にとっては好ましい環境ではない。

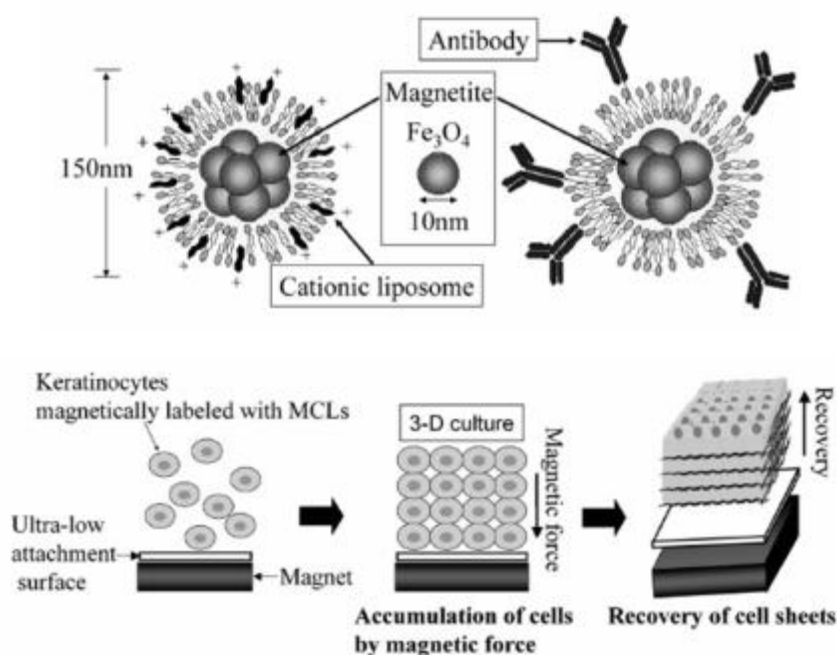


Figure 1.9 磁気ナノ粒子の構造（上）と三次元組織の構築（下） [15, 16]

電気化学的手法

シカゴ大学の Yeo らは、正負の電位印加による細胞の脱離法を報告している[17]。まず、金表面に自己組織化単分子膜（SAM）を形成する。その単分子膜には二種類の分子が用いられ、それぞれ正と負の電位（ $\pm 650 \text{ mV}$ ）を印加することで、分子の途中の結合が切れる性質を有している。その単分子膜上に細胞接着性ペプチド（CCRGDS）を作用させると、ペプチド末端のシステイン部分のチオール基がジスルフィド結合により、SAM 分子に修飾することができるので、細胞を接着することができる。つまり、SAM 上に細胞を播種し、ある一定の電位を印加すれば、電位を印加した部分の分子が切断され、金表面から脱離するに伴って細胞も回収できるという手法である。実際に、金基板上に細胞をパターンニングし、電位を印加した部分のみの細胞が脱離したと報告している。

また所属研究室では、アルカンチオールの還元脱離現象を利用した細胞回収法を報告している。まず、金表面にアルカンチオール(10-carboxy-1-decanethiol)の SAM を形成し、その末端に細胞接着性配列を含んだペプチド(GRGDS)をカルボジイミド法で修飾する[18, 19]。そこへ細胞を播種し、組織を形成するまで培養した後に、負電位 -1.0 V を 5~10 分間印加すると、還元されて金-チオール結合が切れることで細胞を回収できると述べている（Fig. 1.10）。この手法により、実際に二次元細胞シートや三次元球状組織体（スフェロイド）の回収に成功し、電位印加により回収した細胞の生存状態も良好であったと報告している。

これらの手法は低電位を短時間印加するだけで細胞が回収可能であり非常に簡便であると言える

が、細胞組織を構築し生体内へ移植するなど治療に用いた際に、脱離した細胞に残ったままの SAM 分子が生体内に与える影響が懸念される。以上のような細胞脱離・回収法が研究されているが、臨床応用にはまだ問題があるものや、回収時間の短縮が必要なものなど、更なる改善が求められている。

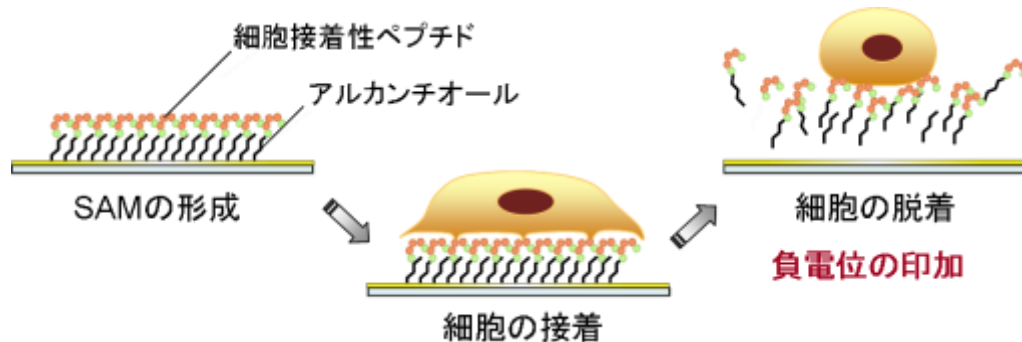


Figure 1.10 SAM の電気化学的還元脱離反応を利用した細胞脱着法[17, 18]

1.1.9 肝臓の機能と構造

【肝臓の構造】

肝臓はその身体の中で全体重の約 1/50 を占める最大の臓器であり、生命維持に必要な代謝・解毒などの多くの機能を持っている。その重量は、ラットでは約 10g、成人ヒト肝臓では約 1400g であり、1g 当たり $1 \sim 2 \times 10^8$ 個の肝細胞が存在するといわれている[20]。ヒトの場合腹腔の右上部、横隔膜直下に位置しており、肝鎌状間膜を境に大きな右葉と小さな左葉とに分かれ、右葉の下部には尾状葉と方形葉がある。肝細胞が集合して、小葉間結合組織で区切られた肝小葉と呼ばれる多面体の構造をとり、この肝小葉が多数集合して肝臓を構成している[21]。肝細胞の配列ならびに血管および胆管の走行との間の解剖学的な関係が肝小葉を形成すると考えられており、その中心に中心静脈が位置し、その周縁角に門脈域が位置している。門脈域を肝外から入ってきた肝動脈と門脈、および肝外へ向かう胆管が併走している。肝臓には肝小葉辺縁から酸素に富んだ動脈血と消化管や脾臓から門脈へと集まる栄養分に富んだ静脈血の 2 種類の血液が流入し、中心静脈に合流した後、肝静脈にから下大静脈に流れる。一方、胆管系は肝細胞索の肝細胞同士が接する面に肝細胞膜で囲まれて形成された毛細胆管に始まり、それらを集めた胆管が門脈域を肝動脈や門脈とは逆方向に走っている。このような構造が肝臓本来の機能を発現するために必要な最少の単位である[22](Fig. 1.11)。

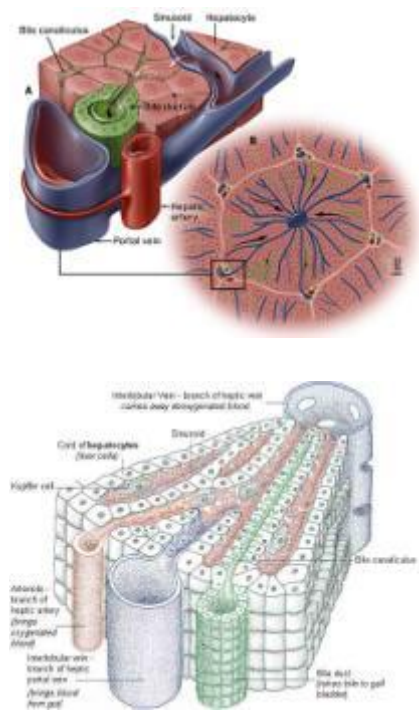


Figure 1.11 複雑な肝小葉構造
[21]

肝臓は、総細胞数の約 70%を占める肝実質細胞と、約 30%の非実質細胞からなる。肝機能改善を目

的とする研究には、当然ながら機能の担い手である肝実質細胞（以下、肝細胞）が対象となる。肝細胞の培養研究において、肝細胞の立体構造が機能発現に大きく関与していると考えられているが、一度生体外に取り出されるとその構造の維持が難しいことが指摘されている。

【肝臓の機能】

肝臓の機能は主に、代謝・解毒・排泄の3つの機能に分類できる。代謝機能は、吸収された物質を分解・合成し、別の物質に変える機能で、糖質代謝・蛋白質代謝・脂質代謝がある。

＜糖質代謝＞

糖質は腸内でブドウ糖に分解された後、小腸で吸収されて肝臓に運ばれ、グリコーゲンという形に変えて貯蔵される。糖分が必要となると分解され血中にブドウ糖が放出される。

＜蛋白質代謝＞

蛋白質は、小腸でアミノ酸に分解されてから吸収され、肝臓に運ばれる。このアミノ酸からさまざまな蛋白質を合成している。使われないアミノ酸は分解され、窒素酸化物、アンモニアを経て尿素になり、尿中に排泄される。この蛋白質合成によって血漿蛋白質などを合成し、血液中に放出している。血漿蛋白質には、アルブミン、グロブリン、リポ蛋白、血液凝固に必要なフィブリノーゲン、プロトロンビンなどの血液凝固因子がある[23]。

＜脂質代謝＞

脂肪は、胆汁と膵臓から分泌される酵素によって遊離脂肪酸とグリセロールに分解され、小腸で吸収、そして小腸粘膜で再び中性脂肪に合成されてリンパ管を経て大循環血流に入り、肝臓に取り込まれる。肝臓では、脂肪酸の合成、分解の他、コレステロールやリン脂質の合成が行われている。

解毒機能は、体に入った異物をさまざまな化学反応で毒性が少なく、かつ排泄しやすい水溶性物質に変え、尿中や胆汁中に排泄する機能である。薬物代謝酵素系による薬物の酸化や水酸化、アルコールやアンモニアの代謝・処理などが行われている。また、肝臓の類洞にあるクッパー細胞は、門脈から肝臓内に入った毒素や異物を食べることで解毒作用を行っている。

排泄機能は、体内で生じた代謝産物または外因性の有機陰イオンを取り込んで胆道に胆汁として排泄する機能である。肝臓は胆汁の分泌、胆汁酸の生成分泌、コレステロール、リン脂質、ビリルビン等の分泌を行っている。また、ビリルビンは、大部分が胆汁中に放出されて体外に排出されるが、一部は小腸内で腸管から吸収され再び肝臓に戻る腸肝循環が行われている。

1.1.10 生体外で三次元組織を作製すること

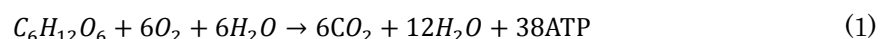
組織工学における「ものづくり」は、通常の工学的なプロセスにおける製品の作製工程とは大きく異なり、技術的な問題以外に、作製過程で以下の特性を考慮する必要がある。

1. 臓器・組織の部品が生きた(部品)細胞であり、常に酸素や栄養素を消費する。
2. 組織作製中は無菌状態を維持しなければならない。
3. 作製した製品(組織)が時間経過によって変化する。

特に、1. は最終的な細胞の品質(状態)を左右する大きな要因であり、3次元組織を作製する上で、この培養環境における酸素濃度について十分に留意する必要がある。

1.1.11 細胞の呼吸とエネルギー産生

ヒトは、生命活動を行うために、呼吸により酸素を取り込んでいる。取り込まれた酸素は、赤血球と人体に張り巡らされた血管によって体中を巡り個々の細胞まで運搬される。酸素存在下では細胞は、この酸素を消費し、ミトコンドリアのクエン酸回路と電子伝達系によって、グルコースから ATP を産生する。



グルコース 1 mol を完全に燃焼させ、発生する熱量を熱力学的に計算すると約 2881 kJ になる。また、ATP 1 mol のもつエネルギーは約 33 kJ である。好気呼吸全体で、グルコース 1 mol から最大で 38 mol の ATP が生成するので、グルコース 1mol のもつ化学エネルギーの 2881 kJ のうち、 $33 \text{ kJ} \times 38 = 1254 \text{ kJ}$ が ATP に移行し、残りは熱エネルギーとして失われる。したがって、そのエネルギー効率は、 $1254 \times 100 / 2881 = 43.5$ [%] である。

一方で、酸素がない嫌気環境下においては、細胞の解糖系のみが働くため、



となり、1 mol のグルコースから 2 mol の ATP と 2 mol の乳酸しか産生されない。そのエネルギー効率は約 $66 \times 100 / 2881 = 2.3$ [%] であり非常に悪いことが分かる。したがって、酸素がない状態が続けば、細胞は生きていくためのエネルギーを得ることができなくなりやがて死に至る。

1.1.12 三次元組織の培養における酸素濃度

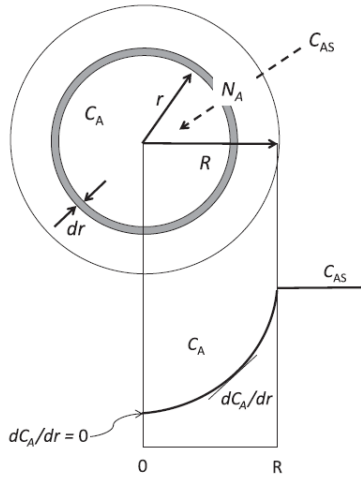


Figure1.12 酸素拡散の組織モデル

in vitro における細胞培養では、主に、培養液に溶け込んだ酸素のみが、細胞への酸素の供給源となる。空気中の酸素が培地などの液体に溶けて、溶存酸素になるには、気相の酸素分子が液相へ移動しなければならない。この時の単位容積当たりの酸素移動速度 (Oxygen transfer rate; OTR [mol・m⁻³・s⁻¹]) は、式 (3) のように表される

$$OTR = k_L a (C^* - C) \quad (3)$$

$k_L a$: 酸素移動容量係数 [s⁻¹], C^* : 気泡の酸素分圧と平衡な溶存酸素濃度 [mol・m⁻³]

C : 培養液中の溶存酸素濃度 [mol・m⁻³]

培地に溶け込んだ酸素が、細胞集塊内部へ到達するか否かは、細胞の呼吸速度、酸素の拡散係数、細胞密度などの基本情報が得られれば、以下のような条件のもとで定常状態を仮定することによって推算できる[24, 25]

- 1) 細胞組織は球形である.
- 2) 細胞は均一に分布している.
- 3) 酸素が唯一の律速因子である.
- 4) 酸素の拡散性は集塊内で一定、拡散速度は Fick の法則に従う
- 5) 酸素速度は濃度によらず一定

ここで、Fig. 1.12 のような組織モデルを考えると

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (4)$$

つまり酸素の拡散流束 N_A は式で表せる。

$$N_A = D_{Ae} \frac{dC_A}{dr} \quad (5)$$

N_A : 酸素の拡散流束 [mol・m⁻²・s⁻¹], D_{Ae} : 有効拡散係数 [m²・s⁻¹], C_A : 細胞集塊内の溶存酸素濃度 [mol・m⁻³]

細胞集塊表面における溶存酸素濃度を C_{AS} として、酸素が細胞集塊内部に拡散移動していく状況を想定する。さらに、任意の半径 r および $(r + dr)$ の球面で囲まれた球殻 (微小空間) を設定し、この部分でおこる呼吸による酸素消費を伴う酸素拡散移動の物質収支をとると、

$$(\text{流入}) - (\text{流出}) + (\text{生成}) - (\text{消費}) = (\text{蓄積})$$

となるが、細胞組織内での酸素の生成と蓄積は 0 と考えられるので更に単純に、

$$(\text{流入}) - (\text{流出}) - (\text{消費}) = 0$$

となる。つまり、流束の式と呼吸に関する式

$$r_{O_2} = Q_{O_2} \cdot A \cdot V \quad (6)$$

r_{O_2} : 呼吸速度 [mol・cm³/s], Q_{O_2} : 1 細胞あたりの比呼吸速度 [mol/cell/s], A : 細胞密度 [cell・cm³] より、

$$(4\pi r^2 N_A)_{r+dt} - (4\pi r^2 N_A)_r - 4\pi r^2 dr(r_{O_2}) = 0 \quad (7)$$

式(7)が導かれる。つまり、細胞が晒されている局所的な酸素濃度は

$$D_{Ae} \left(\frac{d^2 c_A}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dc_A}{dr} \right) - r_{O_2} = 0 \quad (8)$$

この式(8)が意味する所は、組織内部の酸素濃度は、拡散係数 D_{AS} と組織の半径 r と酸素消費速度 r_{O_2} によって規定されるということである。

ここで組織内に

$$Q_{O_2} = 0.4 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells/sec} \quad A = 10^8 \text{ cells/cm}^3 \quad D_{Ae} = 3 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$$

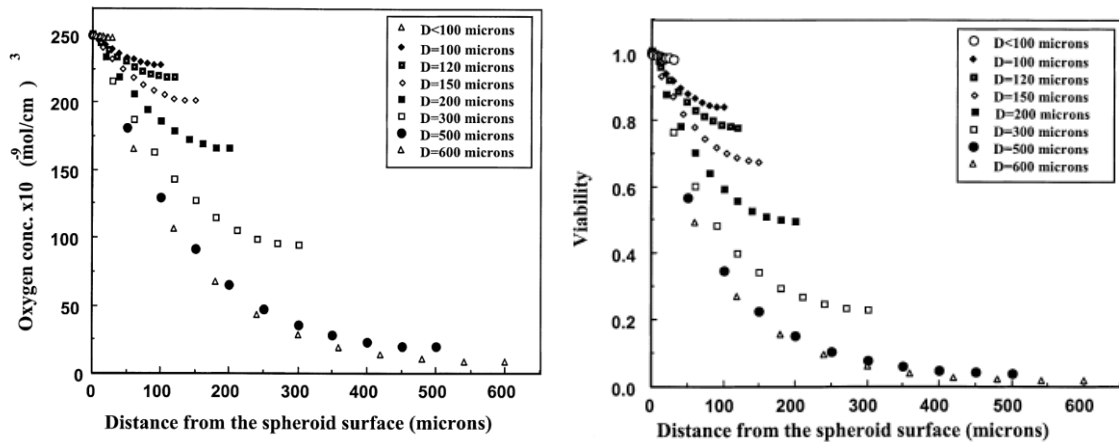


Figure1.13 組織の大きさと酸素濃度[26]

を代入し、各組織の大きさに対する組織表面からの距離と酸素濃度が計算できる。この結果より、酸素濃度は直径が 200-300 μm を超えると中心部は最表面に比べて半分以下に落ち込み、細胞は低酸素状態に陥ってしまうことが分かる[26]。また直径が 500 μm を超えると中心から 400 μm 程度のエリアの細胞が低酸素状態に陥る。一般的に細胞は、1%以下の低酸素状態において、5-10 分ほどでミトコンドリア膜電位の低下が起こり、30 分ほどで DNA の断片化、60-120 分で不可逆的なダメージすなわち細胞死を引き起こす[27]。また、細胞種によって、酸素要求量や低酸素環境での耐性が異なるため、耐性の低い細胞はこれよりさらに早くネクロシスを引き起こす。つまり、たとえ組織周囲を飽和酸素濃度に維持しても、内部まで十分な酸素は供給できないことになる。血管の欠落した空間で酸素要求量が高い肝細胞を最密充填すると厚さ 100 μm が限界であり、1/10 の細胞密度だとしても 500 μm 程度が酸素供給の限界である[28]。以上の理由から、500 μm 以上の組織で且つ肝臓や膵臓といった細胞密度の高い組織を作製しようとした場合には、組織内部に送液可能な血管構造が必要である。

1.1.13 作製中の溶存酸素量と虚血再灌流によるダメージ

一方で、組織の作製中は、外界からの酸素の供給が一時的にストップすると考えられる。つまり、たとえ組織内に血管構造を備えた3次元的な構造を作製できる技術があったとしても、作製中の酸素についても考慮し組織の溶存酸素が枯渇する前に組織への酸素供給をスタートさせる必要がある。これは、たとえ組織内に血管構造があったとしても同様である。

外界からの酸素供給がなくなるとすると、 $Q_{O_2} = 0.4 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells/sec}$ $A = 10^8 \text{ cells/cm}^3$ とした場合、組織内の酸素は約10-15分程度で枯渇する計算となる。この時間が長引けば、細胞にダメージが蓄積される。更に、酸素の供給を開始すると虚血再灌流によって活性酸素が発生し、これらもまた細胞にダメージを与える。つまり、組織の培養だけでなく、組織の作製のプロセスにおいても酸素濃度を高く保つ必要がある。

つまり、「如何にして作製時間を短くするか」ということも組織作製においては重要な意味を持つ。

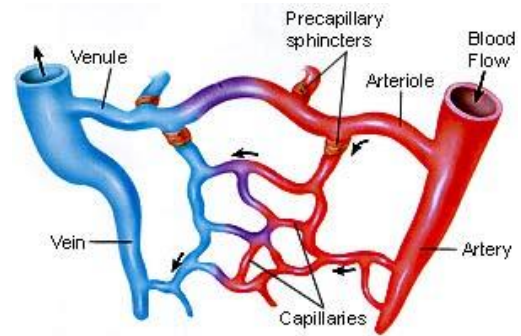


Figure 1.14 体内の血液循環(Biosbcc;
<http://www.biosbcc.net/doohan/sample/htm/vessels.htm>)

1.1.14 作製後の組織の自己組織化、組織のサイズと細胞数

生体組織は $1 \times 10^8 \sim 10^9 \text{ cells/cm}^3$ ほどの細胞密度である。一方で、作製プロセスにおける酸素消費の観点から、組織作製時点ではその細胞数はできるだけ低いほうが、有利である。つまり、初期細胞数と移植時の到達細胞数と酸素消費はトレード・オフの関係である。

そのため、最も理想的な形は、初期細胞数は低く設定し、一定の培養期間中に細胞を増殖させ、目標の細胞数まで組織を成熟化させる方法であろう。このようにすることで、作製中の酸素消費を抑えることができ、組織内部の生物学的な機能低下を免れられる。

1.1.15 血管新生と既往の血管作製法

生体にとって非常に重要な血管は、総延長が10万kmにも及ぶと推定される血管網が張り巡らされている。この毛細血管の内腔側は、たった一層の内皮細胞で覆われている。この内皮細胞の機能として、(1)物質透過性の調節、(2)抗血栓性、(3)血管緊張性の調節、(4)血管新生能が挙げられる[29]。

血管新生は既存の血管から新しい毛細血管ができる現象であり、血管内皮細胞がその主役を演じる。血管新生は、成人の正常な人体にみられる生理的な現象や、癌などの特定の疾患にみられる新しい血管が形成されるプロセスであり、個体発生から腫瘍血管形成などの病的状態まで多くの生物学的過程で重要な役割を果たしている。その分子メカニズムは長い間不明であったが、最近その基本的な機構として、血管内皮細胞成長因子・血管透過性因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF/vascular permeability factor, VPF) が発見され、これらの因子に関する報告が増加している。

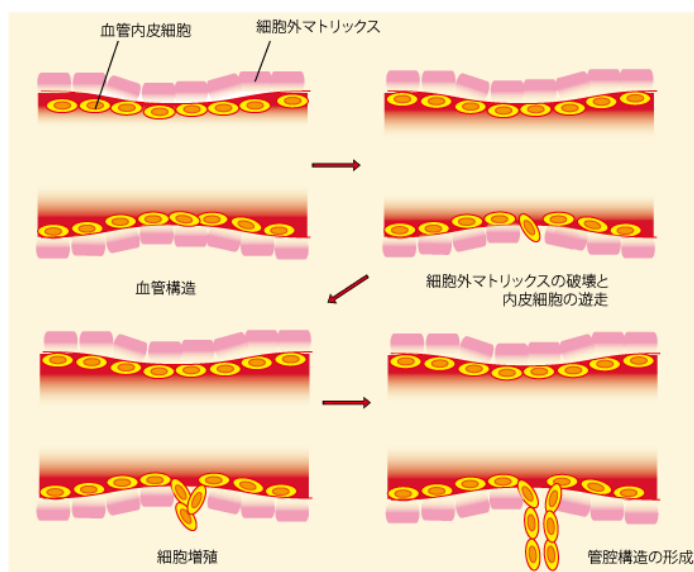


Figure 1.15 血管新生のメカニズム

血管新生の段階は、**Fig. 1.15** に示した様に複雑な過程である。

- (1)内皮細胞に産生されたプロテアーゼによる基底膜の分解
- (2)内皮細胞の遊走
- (3)内皮細胞の増殖
- (4)内皮細胞の管腔形成

これらの過程を経て、基底膜の形成と周辺細胞の取り込みなどが起こる。培養血管内皮細胞を用いて血管の各段階における *in vitro* のアッセイ法がよく行われるが、(4)管腔形成能は、ゲル化したコラーゲンやフィブリンの中で管腔を形成する内皮細胞の性質を利用して、管腔の長さを測定することで、管腔形成能を定量評価する方法が用いられている。

例えば、カリフォルニア大学の **Martin** らは、マイクロビーズに血管内皮細胞を覆わせて、フィブリンゲル内で培養することで血管新生を引き起こし、管腔構造を伸展させたと報告している[30]。この方法では、

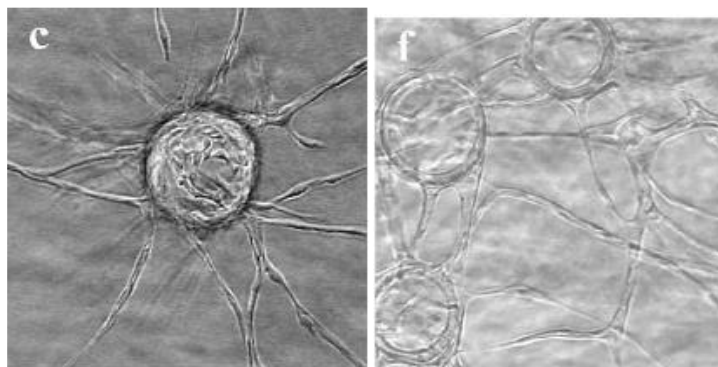


Figure 1.16 フィブリンゲル中での血管内皮細胞による管腔形成[28]

多数の毛細血管様構造がマイクロビーズ表面からフィブリンゲル側に伸展し、一週間程度の培養で、近接したビーズから伸長した管腔構造同士が接続して、ネットワーク構造を形成させたと述べている(**Fig.**

1.16)。このように、コラーゲンゲルやマトリゲル内で血管内皮細胞を培養すると、自発的に管腔形成するという性質を利用して血管網類似構造を作製する方法は数多く報告されている。このような血管内皮細胞の自発的な血管新生能を利用して生体外、または生体内で移植可能な血管構造を作製する試みが行われている。

1.1.16 ミクロな血管構造作製法(血管新生) *in vitro* or *in vivo* prevascularization

現段階で、血管構造作製の方法を大きく分けると、血管作製自体を、生体外で全て行うのか(*in vitro*)、または移植した後の生体の力を借りて血管構造を作製するのか(*in vivo*)という 2 種類である。

In vivo アプローチ

Neovascularization

このアプローチは、生体に存在している血管内皮細胞の血管新生能を最大限に利用する方法である。前述のように、血管内皮細胞は自発的に、新たな血管を作製し血管ネットワークを形成する性質がある。これは、主に VEGF や PDGF などの増殖因子によってアクティベートされ、この増殖因子の、濃度が高い方へ血管を伸長させることが分かっている。つまり、高分子材料やハイドロゲルに、予めこのような増殖因子をぶら下げておき、それとともに実質細胞を包埋したものを作製する。これをそのまま、生体内の欠損部位に移植すると、欠損部位の近くの血管から実質細胞が存在する足場材料へ新たな血管を伸長させる。移植後まもなく実質細胞へ血液を介して養分供給が再開される。この手法は、生体の再生能力を最大限に利用する非常にシンプルな方法である。

しかし、この手法は、すべてを細胞の再生能力に頼るため、血管内皮細胞が、移植片に血管ネットワークを形成するのは 2 週間から 4 週間の期間を要する[31]。そのため、その間に実質細胞は常に低酸素の状態に晒されてしまい、正常な機能を発揮することが出来ない。つまり、この方法は、比較的組織が薄く、血管からの酸素供給がなくてもある程度生存できるような組織に限られてしまう。また、作製した血管構造は全て細胞任せであるので、その構造を制御することは出来ず、均一に血管ネットワークを形成させるのは不可能である。

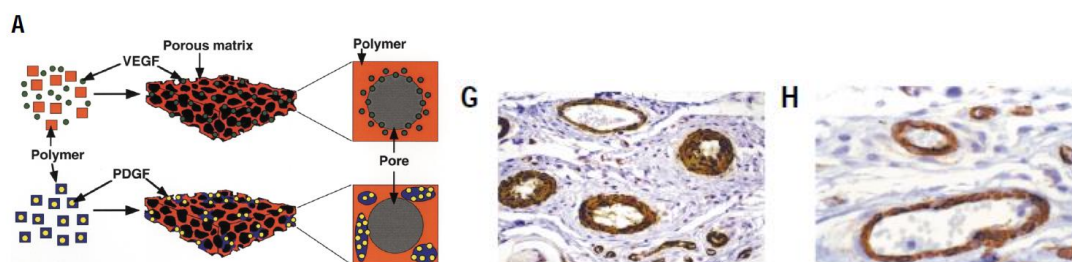


Figure 1.17 Neovascularization を用いた血管構造の誘導[31]

In vitro アプローチ

In vitro アプローチでは、生体外である程度の血管構造を作製した後に生体に移植し、機能を取り戻させようとする試みである。このアプローチは、医学や生物学の要素よりもより工学の技術が必要とするようなアプローチである。

Prevascularization

この手法は、患者から血管内皮細胞を採取して、その内皮細胞の血管新生能を利用し、ハイドロゲルまたは高分子材料の中に予め血管ネットワークを形成させる手法である[32] (Fig. 1.18)。そして、その足場材

料を、実質細胞とともに欠損部位に移植し生体の能力を回復させる。この手法は、**Neovascularization** に比べて、移植した時点ですでに血管ネットワークが形成されているので、形成された血管ネットワークを含んだ組織を移植すると、ホストの血管が引き込まれる。その後、移植した血管内皮細胞がホストの血管を包み込むように伸長し、やがて 2 つの血管は吻合される (**Fig. 1.19**)。このプロセスは **Wrapping and tapping anastomosis** と呼ばれ、これにより、移植した血管網を通して、組織内に酸素を豊富に含んだ血液を還流

することができる[33]。しかし、この方法を用いて作製した血管ネットワークは、その配置がランダムであり制御することができない。前述したように、肝臓の最小単位である肝小葉では、類洞と呼ばれる血管構造が放射状に張り巡らされ、隙間なく整列している。この類洞の規則的な配置と有窓構造により血液と肝細胞間の効率の良い物質交換を可能にしている。つまり、効率のよい血液の運搬を行うためには、規則的に血管が配置されていることが重要である。また、生体外で培養し血管ネットワーク形成を待つ時間が長いため、高密度で肝細胞を懸濁した際には、培養段階で肝細胞の壊死が起こり、移植する前に肝細胞の機能が失われてしまうといった問題点もある。

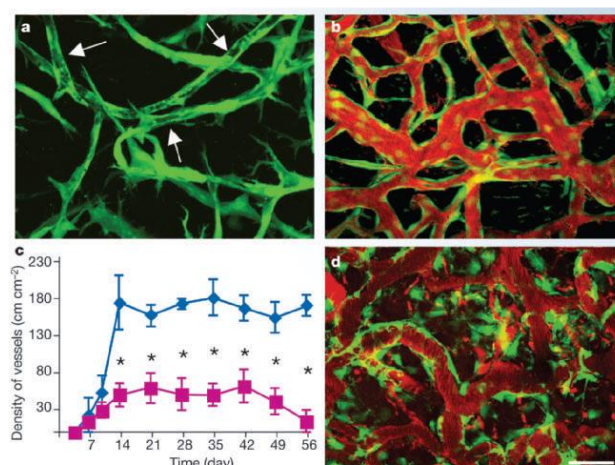


Figure 1.18 自発的な血管新生能を用いた血管網構造の構築[32]

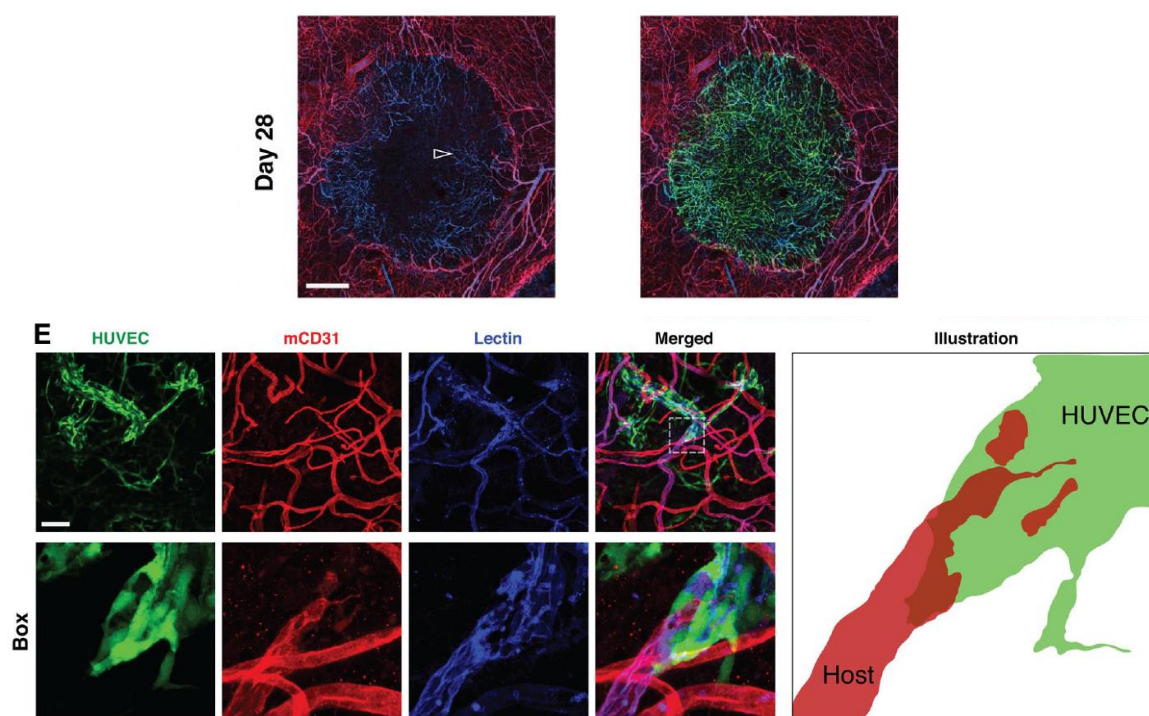


Figure 1.19 ホスト血管の伸長と移植した組織との血管吻合
(Wrapping and tapping anastomosis)[33]

1.1.17 マクロな血管構造作製法

Bioprinting and Organ printing

バイオプリンティング技術は、近年非常に身近になった 3D プリンター技術を元にして開発され、紙や物体を印刷するように臓器を生体外で印刷（作製）するというアプローチである。バイオプリンティングでは通常材料(金属、プラスチック)のかわりに、生体適合性の高い材料と臓器の細胞を用いて臓器そのものを作製する手法である。この手法では、プリンティングにより血管内皮細胞も使用して、血管構造も含めた臓器の構造を作製する。

Fig. 1.20 は、Wake Forest Institute の Anthony Atala らによって作製された膀胱組織である[34]。

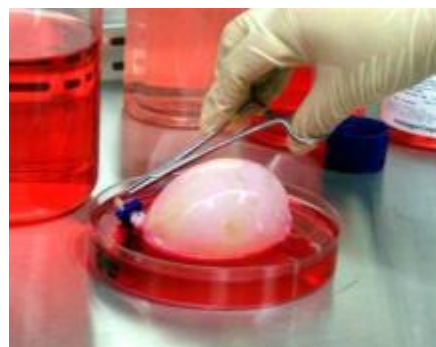


Figure 1.20 オーガンプリンティングにより作製した膀胱組織[34]

ミズーリ大学の Cyrille Norotte らはこのバイオプリンティング技術を利用して血管構造の作製を試みている[35]。インクジェットプリンターを用いた血管構造の作製は、細胞と材料を一つのドット（液滴）の中に入れそれを連続的に射出しを変えながらゲル化させることで 3 次元的な構造を構築できる。厳密にはゲルビーズが集まった形をしているが、ゲルビーズを小さくすることで解像度よく血管構造を作製することに成功している。一方で、解像度を高くすればするほど、組織作製には時間がかかるため、前述の理由から、血管構造のような微小な構造を含んだ細胞密度の高い組織を作製するのには適していない。

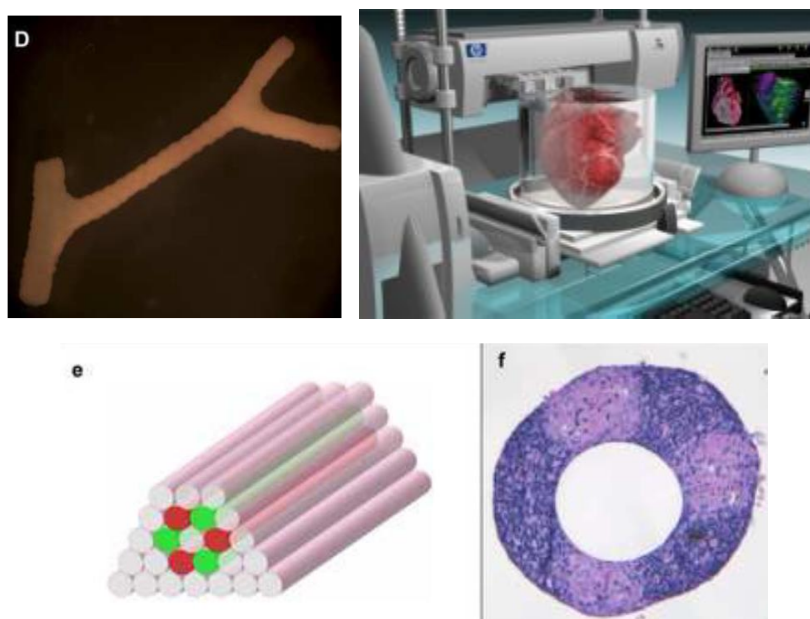


Figure 1.21 バイオプリンティングを用いて作製した血管構造[35]

脱細胞化技術を用いた血管構造の作製

細胞や細胞外マトリクスや足場材料を用いて血管構造を作製する以外に、脱細胞化技術を用いた作製方法がある。この方法は、1 からすべてを作製するのではなく、マウスやラットなどの臓器を、細胞を全て取り払い血管構造だけの骨組みにして利用する方法である。ハーバード大学の Basak らはラットの肝臓をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)により脱細胞化し、血管構造であるマイクロ流路構造だけを残し、最後に血管内皮細胞を血管の中に培養することにより、ヒト以外の細胞外マトリックスの中にヒトの血管内皮細胞で覆われた血管様構造を構築した[36] (**Fig. 1.22**)。これによって作製した血管構造は元々、マウスの血管構造であるので、非常に精密でかつ送液できるという特徴を持っている。同様に、ハーバード大学の Harald らはマウスの心臓を脱細胞化させ、血管を通して心筋細胞を播種することによって、電気刺激によって細胞が拍動するような心臓組織の開発に成功している[37] (**Fig. 1.23**)。これらの手法は、元々生体の臓器を用いるため、構造的にはヒトに近いものとはいえ、他の動物の臓器を使うことしか出来ないため、ヒトと比べて様々な違いがあることが問題点となっておりヒトへの応用は、まだ幾つもの課題をクリアする必要がある。また、もしヒトの臓器を脱細胞化し他のヒトの細胞に置き換えることができたとしても、結局はドナー数に限界があり、根本的な解決にはなっていない。

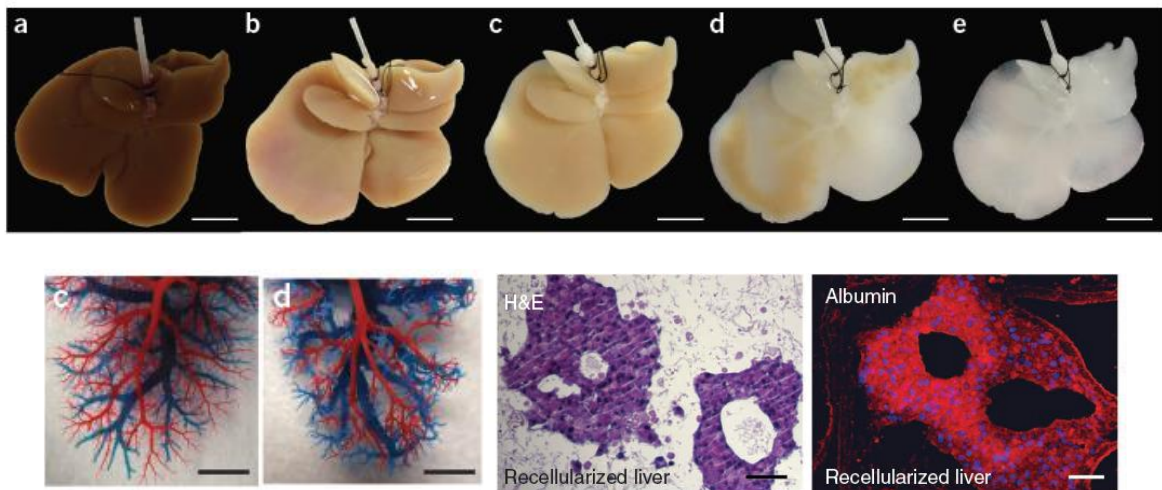


Figure 1.22 ラットの脱細胞化肝臓を用いた血管構造の構築[36]

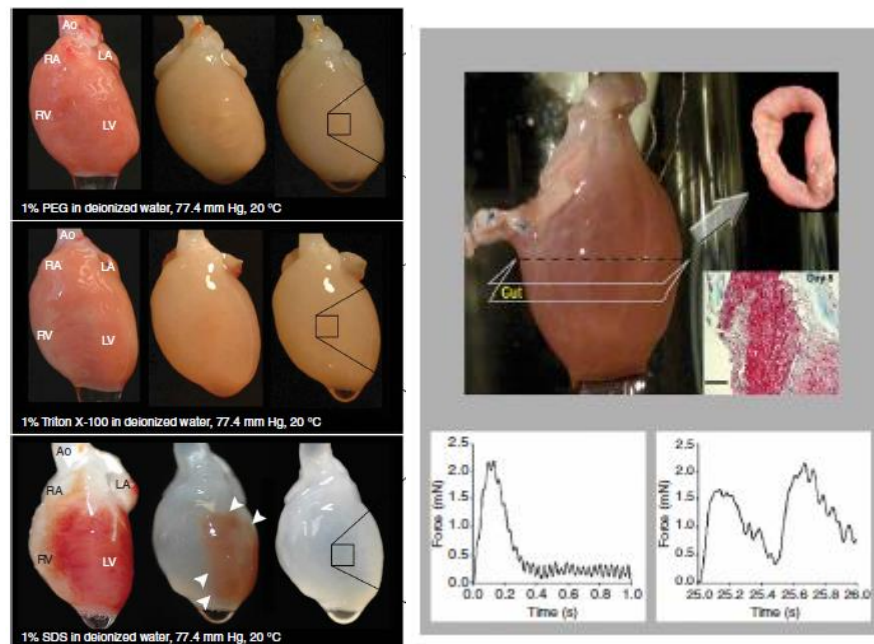


Figure 1.23 脱細胞化マトリックス技術を用いた送液可能な人工心臓[37]

Cell seeding approach

これに対して九州大学の武井らは、血管内皮細胞の能力に頼ることなく、直径 $500\ \mu\text{m}$ ほどの口径が大きく送液可能な血管様構造を工学的に作製した(**Fig. 1.24**)。これは、ナイロンファイバーを鋳型として、予めコラーゲンゲル内に直径 $500\ \mu\text{m}$ の直線上の流路構造を形成しておく。その後、血管内皮細胞を含んだ細胞懸濁液を流路構造内に流し入れ、細胞を播種することで、内壁が細胞によって覆われた血管様構造を作製した。また、アクリル製のデバイスにシリンジの針を固定しているため、作製した後に血管様構造に培養液を送液することが可能であり、実際にせん断応力が細胞に付加できていることを述べている。さらに、VEGF を作用させることで、直線状の管腔構造を始点としてゲル側に伸展していく血管内皮細胞の管腔形成能を評価している。このグループではナイロンファイバーではなく、分解可能なアルギン酸塩のファイバーを用いて、直線以外の様々な曲線状の血管構造を作製することにも成功している[38]。しかしながら、この方法では、内皮細胞を播種する際に、一定の時間ごとにデバイスを 90° 回転させて、偏りなく細胞を接着させなければならない。また、この手法ではコラーゲンゲルのゲル化に 20-30 分の時間を要し、アルギン酸ゲルの分解に 30 分、細胞接着には 1 時間程度の時間が掛かる。つまり、周囲のコラーゲンゲル内に他の細胞を導入して組織を構築する場合、細胞が周囲を覆うまでに時間がかかってしまい、前述と同様の理由で、培地を送液し酸素を供給する前に、周囲の細胞の活性の低下や壊死といった問題が起こってしまうため、実質細胞を組み込んだ臓器の作製には用いることができない。

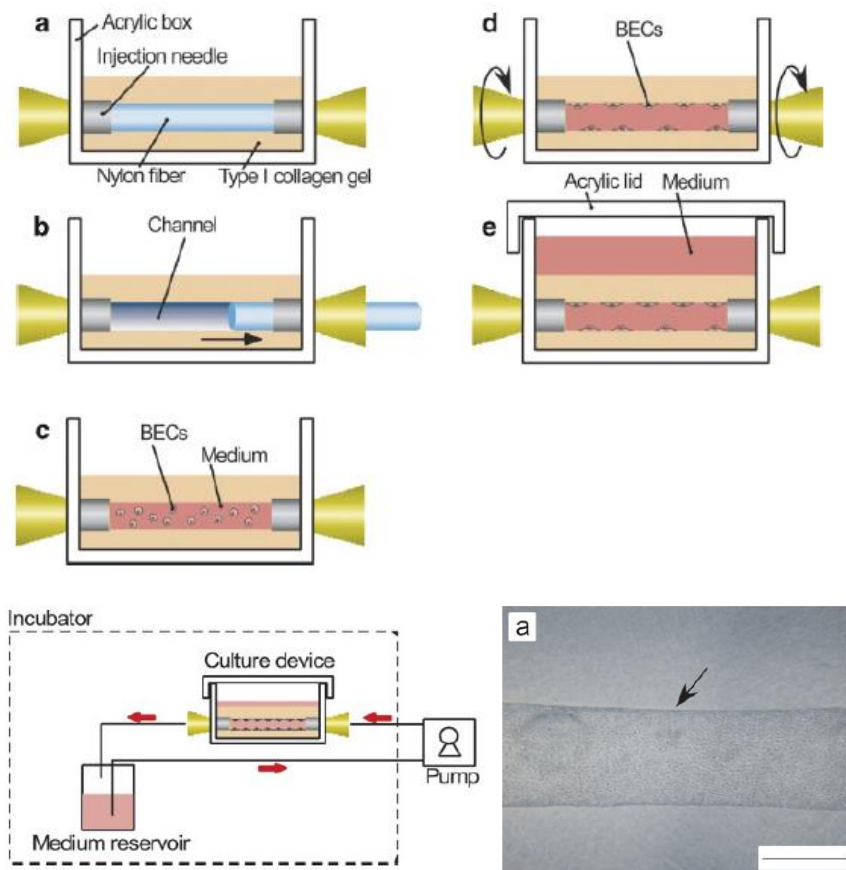


Figure 1.24 血管作製手順と作製した血管構造[38]

同様に、ペンシルベニア大学の Jordan&Chen らは、中空の糖の鋳型を用いて網目状の構造を構築し、周囲をハイドロゲルで覆い、 H_2O を流すことによって鋳型を溶かして、網目状の構造を構築する手法を報告している[39] (**Fig. 1.25**)。ここに、先程と同様に、血管内皮細胞である HUVEC を播種することによって、血管類似構造を作製する。このグループはハイドロゲルに、アガロースゲル、アルギン酸ゲル、PEG ゲル、フィブリンゲル、Matrigel を用いて実験を行なっている。

彼らは更に、予めゲル側にマウス間葉系細胞(10T1/2)を懸濁培養することで、血管内皮細胞がゲルの中へ伸長し新たな血管ネットワークを形成する様子を観察している。鋳型を使って、血管の構造体を作製するというアプローチは自由にその構造をコントロールできるため、複雑な構造もある程度模倣することが可能である点で、血管内皮細胞の自発的な血管新生能のみを用いるアプローチに比べて大きなアドバンテージがあり、肝臓のような構造が大きな意味を持つ組織の作製において非常に有用かつ簡単な方法と考えられる。しかし依然として、作製時間の短縮には至っておらず、細胞接着に時間を要することが原因で、包埋細胞の密度が高くなった場合には、細胞の壊死を引き起こすと考えられる。

一方でワシントン大学、コーネル大学の Zheng らは PDMS のスタンプを使って、血管のような流路を半分ずつ作製しそれを 2 つ重ね合わせることによって、コラーゲンゲルによるマイクロ流路構造を作製し流路構造の中に HUVEC を播種して血管様構造を作製している[40]。血液を血管内に還流する実験では、内表面に血管内皮細胞がない場合と比べると流路の抗血栓性は向上し、連続して血液を流

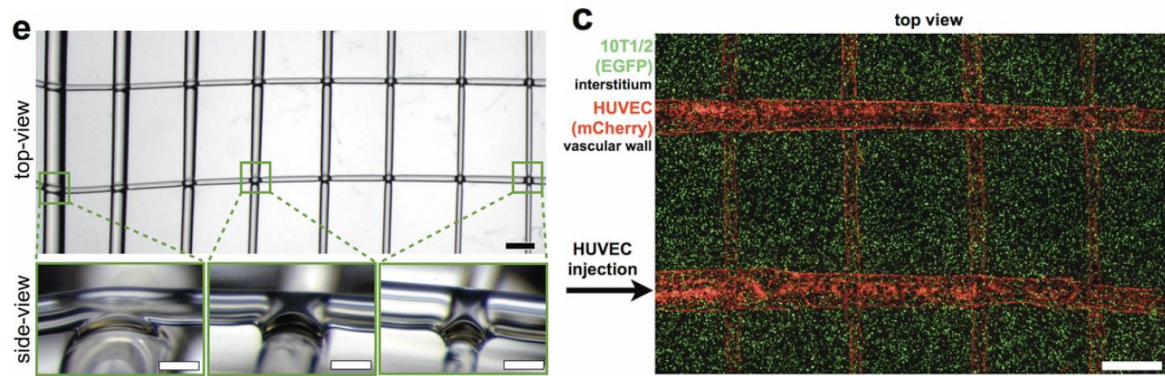


Figure 1.25 糖鋳型を用いたマイクロ流路構造の構築[39]

すことが可能であった。また、蛍光物質を流しこみゲルへの染み出しを測定したところ、物質の透過性が下がったと報告している。彼らはさらに、血管内皮細胞だけではなく周皮細胞を血管内皮細胞とともに培養することによってより血管構造を安定させようと試みている。実際に、周皮細胞を加えると血管の透過性が下がりより安定した血管構造を作製することに成功している(**Fig. 1.26**)。この方法では、直接的な鋳型を用いることはないため、鋳型を溶かすというプロセスがなく更に時間を短縮させることが可能であった。しかし、血管内皮細胞を播種する時間の間、培養液を還流できないといった共通の問題が残っており、実質細胞の密度次第で組織内の細胞の活性が低下することが懸念される。

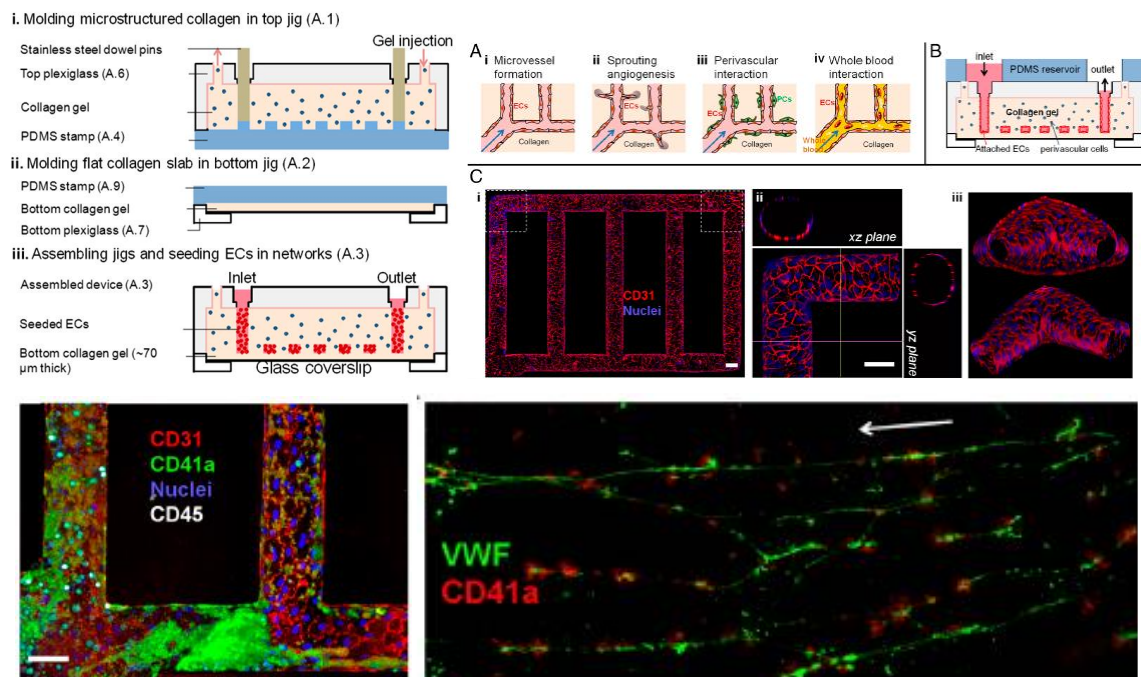


Figure 1.26 フォトリソグラフィ技術と PDMS スタンプを使ったマイクロ流路構造の構築と構築した血管構造[40]

1.2 研究背景のまとめと現状での問題点

以上のように、血管様構造を作製するためには、血管内皮細胞の自発的な管腔形成能を用いるもの、あらかじめ作製した流路に細胞を播種する方法などが一般的に行われているが、送液、組織に応用できないなど様々な問題があることが明らかとなっている。これらの、研究背景、既往研究を整理すると、

1. 血管内皮細胞の自己組織能は非常に強力であるが、*in vitro* での送液培養、構造の制御、100 μm 以上の口径の大きい血管構造の作製は不可能である。
2. 糖などの鋳型を用いて流路を作製した後に、血管内皮細胞を播種し内皮化する方法では、鋳型を溶かす時間と内皮化の時間により、高密度で包埋した細胞は壊死してしまう。また、血管内皮細胞が自発的に作製するような 10-50 μm の微小血管構造を作製することはできない。
3. 短時間で鋳型を除去できる場合においても、依然として内皮化に時間がかかれば包埋した細胞は壊死する。

このように、問題は大きく分けて、以上の 3 種類が少なくとも考えられる。

つまり、これらの問題点から、肝臓のような厚く細胞密度の高い組織を作製するためには、直径が大きな血管を鋳型を用いて作製し、血管内皮細胞を素早くマイクロ流路構造の内表面に転写して、短時間で内皮化を行う技術が必要となってくる。これに加え、血管内皮細胞の自己組織化能力を利用して、微小な血管構造を組織内に作製する方法が最善であると考えた。

1.3 本研究の目的

本研究では、これらの既往研究の問題点を解決し、生体外で厚みのある肝臓組織を作製するために、短時間で組織内部に分岐型の血管組織を構築する技術の確立を目的とした。これを達成するために、本研究ではオリゴペプチドの電気化学的な還元脱離反応を用いて、迅速かつ非侵襲的に細胞を脱離させる技術を確立し、それを円柱状のニードルに適用することで、5分以内にマイクロ流路構造に血管内皮細胞を転写する技術を確立する。そして、iPS 細胞由来の肝細胞を組織内に高密度で充填することで、血管構造を備えた立体的な肝臓組織の構築を研究の目的とした。

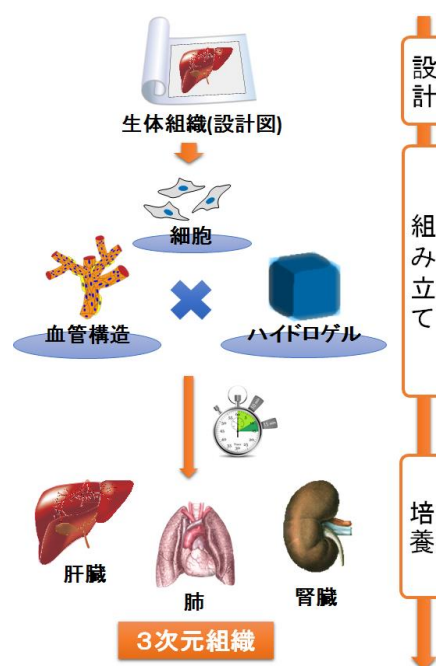


Figure 1.26 立体的な 3 次元組織構築の概

1.4 本論文の構成

第 1 章 序論 研究背景

第 1 章では、従来の臓器移植や人工臓器に代わる新しい治療法としての再生医療について、その社会的意義と注目される組織工学的アプローチについて述べた。組織工学的アプローチとして、生体足場材料を利用し、皮膚や骨などの生体内でも比較的単純な組織が構築可能となってきたものの、組織特有の特性や複雑な三次元構造のために、心筋や肝組織、その他多くの組織や臓器の構築が困難である状況を示した。このことから 2 次元組織と 3 次元組織の違いについて考察した後、3 次元組織を生体外で作製するためのポイントと血管構造の重要性について述べた。一方で、3 次元組織作製の試み自体は行われており、既往研究例として挙げた。既往研究から現状の問題点を整理し、これらを克服する新規技術の開発を本研究の目的として明示した。

第 2 章 電気化学的原理に基づいた血管構造の作製

第 2 章では本研究の基盤技術である電気化学を用いた細胞転写法についてその原理を記述した後、この手法を用いた素早い血管構造作製方法について詳しく述べる。またオリゴペプチドを脱離させるために必要な還元電位を測定し、実際に電位を印加することにより単離細胞を迅速かつ非侵襲的に脱離させることが可能であるかどうかを確認する。さらに、その細胞の脱離挙動について定量的に評価した。更に、作製した血管構造について、血管としての機能であるタイト結合、細胞配向性の変化、細胞の極性変化、血管透過性について評価した。

第 3 章 細胞の自己組織能を利用した微小血管構造の誘導

第 3 章では、前章で作製した直径が $500\ \mu\text{m}$ 程度の構造に加えて、 $10\text{-}100\ \mu\text{m}$ 程度の微小分岐血管

構造を作製した・これは、血管新生、脈管形成という血管内皮細胞の自己組織化能力を用いる方法である。これにより、より複雑な血管構造を組織内に構築することが可能となる。

第 4 章 iPS 由来肝細胞を用いた 3D 肝臓組織の構築

第 4 章では、これまでの検討をふまえた上で、肝細胞を血管組織に導入し、肝臓類似組織を構築した。肝細胞には、増殖性の細胞である iPS 細胞から誘導した肝芽細胞を用いた。これにより、増殖と分化を同時に進めながら、組織の成熟化を図ることが可能である。

第 5 章 腹腔内留置を目的としたデバイスの開発とカニューレーションを利用した肝組織の移植

第 5 章では、これまで作製した組織の移植可能性と、治療への応用を証明するために、実際にマウスに移植した。移植方法には、マウスの門脈にカテーテルを用いて直接接続する方法を用いた。これにより、組織内に作製した送液可能な血管構造を最大限に利用した。また、マウスにヒト肝細胞が充填された肝類似組織を移植することによって。マウス血液からヒト肝細胞が分泌したヒトアルブミンを検出し、本研究で確立してきた肝組織が、機能することを証明する。

第 6 章 結論

本研究を総括し、今後の研究について述べた。

1.4 参考文献

- [1] How Much Does Liver Transplantation in India Cost
<http://www.transplantcounsellor.com/blog/how-much-does-liver-transplantation-in-india-cost/>.
- [2] 移植希望登録者統計（各年末）．日本臓器ネットワーク．
http://www.jotnw.or.jp/file_lib/pc/datafile_hope_pref_pdf/isyokukibousya-toukei-2015.pdf.
- [3] 日本肝移植研究会．肝移植症例登録報告（第二報）．日本肝移植研究会．2006:45-55.
- [4] 型技術協会 一．再生医療．2000 <http://www.jsdmt.jp/>.
- [5] Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. Science. 1993;260:920-6.
- [6] 山中伸弥、中内啓光．幹細胞．日本再生医療学会．2012.
- [7] Strelchenko N, Verlinsky O, Kukharensky V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. Reproductive BioMedicine Online. 2004;9:623-9.
- [8] Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu S-J, Lanza R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. Nature. 2006;444:481-5.
- [9] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell. 2006;126:663-76.
- [10] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell. 2007;131:861-72.
- [11] Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of Chondrocytes Utilizing a Polymer-Cell Construct to Produce Tissue-Engineered Cartilage in the Shape of a Human Ear. Plastic and Reconstructive Surgery. 1997;100:297-302.
- [12] 菊池正紀、金間大介．再生医療を中心とした生体材料研究の現状．
http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt072j/0702_03_featurearticles/3fa01/200703_fa01.html.
- [13] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. Biomaterials. 2003;24:2309-16.
- [14] Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, Sekine H, Sakaguchi K, Kikuchi T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. Nat Protocols. 7:850-8.
- [15] Ito A, Honda H, Kamihira M. [Construction of 3D tissue-like structure using functional magnetite nanoparticles]. Yakugaku Zasshi. 2008;128:21-8.
- [16] Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005;100:1-11.
- [17] Yeo WS, Mrksich M. Electroactive self-assembled monolayers that permit orthogonal control over the adhesion of cells to patterned substrates. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2006;22:10816-20.
- [18] Inaba R, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues. Biomaterials. 2009;30:3573-9.

- [19] Kakegawa T, Mochizuki N, Sadr N, Suzuki H, Fukuda J. Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells. *Tissue Eng Part A*. 2013;19:290-8.
- [20] 竹内修二. カラー図解 人体解剖の基本がわかる事典. 西東社. 2012:102.
- [21] John hopkins medicine "Anatomy of liver". *Gastroenterology&Hepatology*
https://gi.jhsps.org/GDL_Disease.aspx?CurrentUDV=31&GDL_Cat_ID=BB532D8A-43CB-416C-9FD2-A07AC6426961&GDL_Disease_ID=A6D10E80-887D-49A7-B3BB-0517D38CE757.
- [22] Abdel-Misih SRZ, Bloomston M. Liver Anatomy. *The Surgical clinics of North America*. 2010;90:643-53.
- [23] 肝臓のしくみとはたらき. コトバンク.
<https://kotobank.jp/word/%E8%82%9D%E8%7%93%E3%81%AE%E3%97%E3%81%8F%E3%BF%E3%A8%E3%AF%E3%9F%E3%2%9%E3%8D-791958>.
- [24] Lee JM. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. *Biochemical Engineering*. 1991:60.
- [25] Doran PM. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press,. 1995:300.
- [26] Glicklis R, Merchuk JC, Cohen S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004;86:672-80.
- [27] Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*. 1995;374:814-6.
- [28] Folkman J, Hochberg M. SELF-REGULATION OF GROWTH IN THREE DIMENSIONS. *The Journal of Experimental Medicine*. 1973;138:745-53.
- [29] 血管新生のメカニズム.
<http://www.kansetsu.com/kekkannsinnsei.html>.
- [30] Nakatsu MN, Sainson RCA, Aoto JN, Taylor KL, Aitkenhead M, P テラ rez-del-Pulgar S, et al. Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and Angiopoietin-1 筈 . *Microvascular Research*. 2003;66:102-12.
- [31] Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, Mooney DJ. Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*. 2001;19:1029-34.
- [32] Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: Creation of long-lasting blood vessels. *Nature*. 2004;428:138-9.
- [33] Cheng G, Liao S, Kit Wong H, Lacorre DA, di Tomaso E, Au P, et al. Engineered blood vessel networks connect to host vasculature via wrapping-and-tapping anastomosis. *Blood*. 2011;118:4740-9.
- [34] Atala A. Future of Medicine: 3D-printing new organs. [www3derorg](http://www.3ders.org/articles/20120629-future-of-medicine-3d-printing-new-organs.html). 2012
<http://www.3ders.org/articles/20120629-future-of-medicine-3d-printing-new-organs.html>.
- [35] Norotte C, Marga FS, Niklason LE, Forgacs G. Scaffold-free vascular tissue engineering using

bioprinting. *Biomaterials*. 2009;30:5910-7.

[36] Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis M-L, Guzzardi MA, Shulman C, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*.16:814-20.

[37] Ott HC, Matthiesen TS, Goh S-K, Black LD, Kren SM, Netoff TI, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008;14:213-21.

[38] Takei T, Sakai S, Ono T, Ijima H, Kawakami K. Fabrication of endothelialized tube in collagen gel as starting point for self-developing capillary-like network to construct three-dimensional organs in vitro. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006;95:1-7.

[39] Miller JS, Stevens KR, Yang MT, Baker BM, Nguyen D-HT, Cohen DM, et al. Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues. *Nat Mater*.11:768-74.

[40] Zheng Y, Chen JM, Craven M, Choi NW, Totorica S, Diaz-Santana A, et al. In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:9342-7.

第二章 電気化学的原理に基づいた血管構造の作製

2.1 はじめに

本章では、本研究の基盤技術である電気化学を用いた細胞転写法についてその原理を記述した後にこの手法を用いた血管作製方法について詳しく述べる。第2節ではまず電気化学還元脱離を用いた細胞脱離の原理を述べる。第3節では、電気化学を用いた細胞転写法の還元脱離に使用するオリゴペプチドの構造を述べた後にその構造のコンセプトと自己組織化単分子膜(SAM)の形成能その脱離能を評価する。第4節では、足場材料として使う光架橋性ゼラチンゲルの合成方法とその特性について述べる。そして第5節で、この方法を、円柱状の金線の応用する事によって血管類似構造を作製する。更に、6-10節において、様々な角度から、作製した血管構造が血管としての機能を果たしているかどうか、生体の血管とどれほどの類似性があるかどうか、を評価していく。

2.2. 電気化学を用いた細胞脱離と細胞転写法

2.2.1 本節の目的

本節では、電気化学還元脱離反応を利用した細胞転写法の基本原理について述べる。その際、様々な刺激を用いた細胞回収法の先行研究についても触れる。

2.2.2 細胞の回収法

細胞は、生体外で細胞外マトリックスと呼ばれるタンパク質に接着して生存し、接着することによって各種機能を保っている。生体外で細胞を培養する際には、一般に、細胞培養皿というポリエチレンなどの硬い材料に接着させ培養するのが一般的である。再生医療の分野では、このように増やした細胞を、患者の治療のために利用するのがコンセプトであるため、どこかの段階でこれらの細胞を回収する必要があり、細胞を回収する技術が盛んに研究されている。最も広く行われている手法は、酵素処理法と呼ばれ、トリプシンやコラゲナーゼ分解酵素を用いて細胞を培養表面から回収するという手法である。

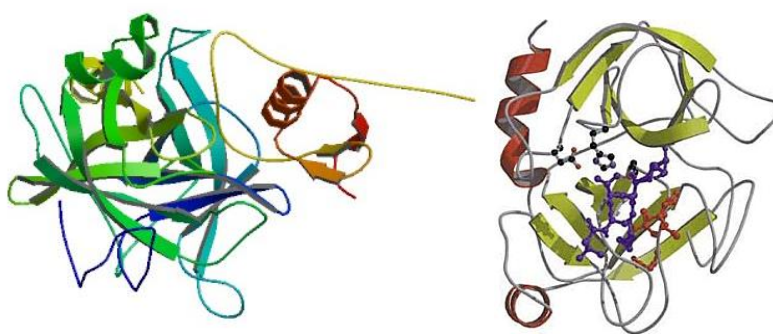


Figure 2.1 トリプシンの立体構造

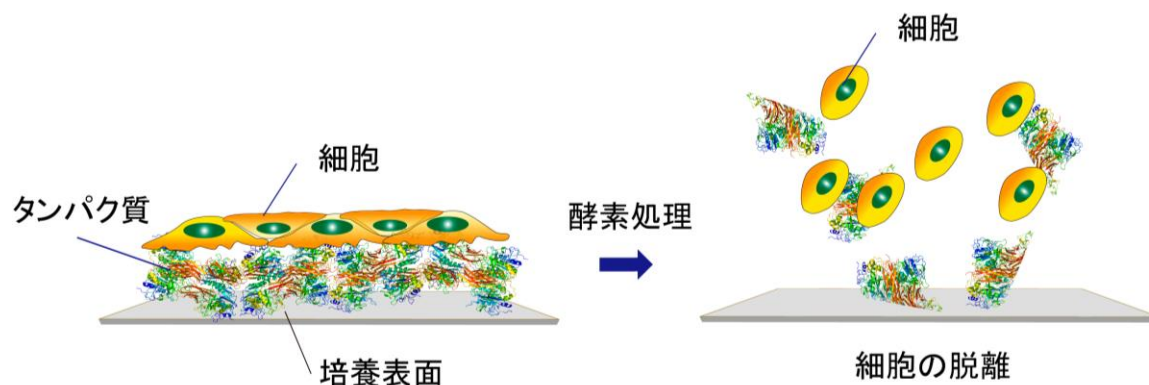


Figure 2.2 酵素処理法による細胞間結合の崩壊

酵素処理法

酵素処理法とは、その名の通り酵素処理反応によって、細胞を培養表面から脱離させる方法である。例えばトリプシンは、塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン）のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解しタンパク質を切断する性質を持つ。細胞は、培養基板と接着をしているが、これらは細胞が出すタンパク質を介して接着している。トリプシンは、このタンパク質の構造を断続的に切断することで、細胞と培養表面との間を切断し、細胞の回収を可能にしている。酵素処理法は、細胞継代の際には非常に簡便な方法であるが、細胞が連なりあった構造体のまま回収したいといった場合には利用できない。なぜなら、**Fig. 2.2** のように、酵素を用いると、細胞と培養表面との接着だけではなく、細胞と細胞の間の接着まで破壊してしまうからである。その理由は、細胞と細胞の間の接着もタンパク質による結合だからである。

温度応答性ポリマーを用いた細胞の回収

細胞を組織のまま、シート状のまま回収する方法として代表的な方法は、温度応答性のポリマーを用いて細胞を回収する方法である(**Fig. 2.3**) [1] [2]。特定の分子構造を持つポリマーは水中で下限臨界溶液温度を有し、ある温度を境にそれより高い温度ではその分子内、あるいは分子間の疎水結合が強まりポリマー鎖が凝集し、逆に、低い温度ではポリマー鎖が水分子を結合し水和し、その相転移現象は可逆的である。ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド (PIPAAm)、側鎖に親水性部分と疎水性部分両方を持つ LCST が 32℃ のポリマーである。すなわち、32℃ 以上の温度で側鎖の疎水性部分であるイソプロピル

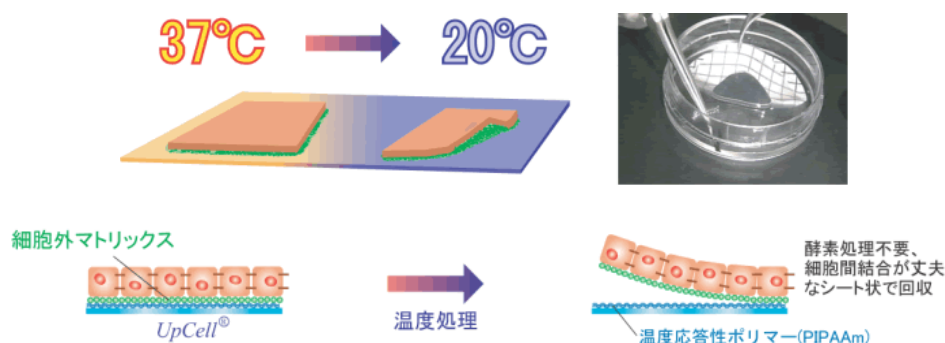


Figure 2.3 温度応答性ポリマーを用いた細胞回収 UpCell® (Cell seed)

基によって分子内、分子間において疎水結合が強まりポリマー鎖が凝集し、32℃より低い温度でもう一方の親水性部分のアミド結合と水分子とが結合するため水に溶解する性質を持っている。つまり、培養基板にこのポリマーを修飾しておけば、培養後、温度を 32℃以下にすることにより細胞と細胞の結合を保ったまま細胞を回収することが出来る。この方法は、特に細胞シート工学に応用され移植の際に細胞の組織体回収に利用されている[3][4]。しかし、この手法では温度を 37℃から 32℃以下にする際に細胞に負担がかかることや、疎水性、親水性の変化に 20 分から 30 分程度時間を要することが問題であった。

犠牲層を用いた化学的な細胞回収

その他にも、予め犠牲層を構築した上に細胞を播種し、細胞が接着したところで化学的に犠牲層を破壊することで細胞と基盤の間の接着を引き離し、細胞を回収するという方法がある(**Fig. 2.4**)。ストラスブール大学の Ogier らは犠牲層として $\text{PVBANH}_3^+/\text{PVBACOO}^-$ を選択しそれを、厚さ 50 nm ほどの膜をディッシュ上にコーティングする。その後細胞を接着させ、TCEP を加えることによって化学的に膜のジスルフィド結合を切断し、犠牲層を脱離させる。犠牲層に接着していた細胞はそれに伴って脱離するという原理である。この方は、TCEP を加えるだけという非常にシンプルな方法であるが、この物質が若干の細胞毒性があること、また脱離に時間がかかるといったような理由から、確立した方法としては普及していない[5]。

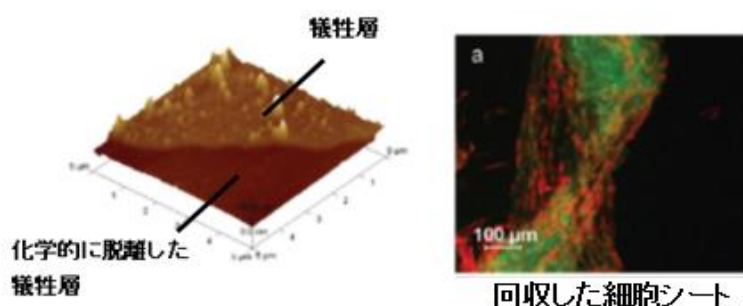


Figure 2.4 犠牲層を用いた細胞回収法。左:犠牲層の AFM イメージ。右:回収した細胞シート[5]

2.2.3 電気化学還元脱離を用いた細胞脱離

このような、各種刺激により細胞回収法がある中で、これらの方法の弱点を補った新しい細胞回収法が求められた。当研究室では、これまでに、電気化学反応を用いた細胞回収法を提案してきた[6]。ここで、電気化学還元脱離を用いた細胞回収法の原理について説明する。原理は非常にシンプルであり、負電位を印加することによって、還元的に脱離できる層を、細胞と培養基板の間に挟むことで脱離することができるのではないかと考えた(Fig. 2.5)。まず細胞の培養表面として金をスパッタリングしたディ

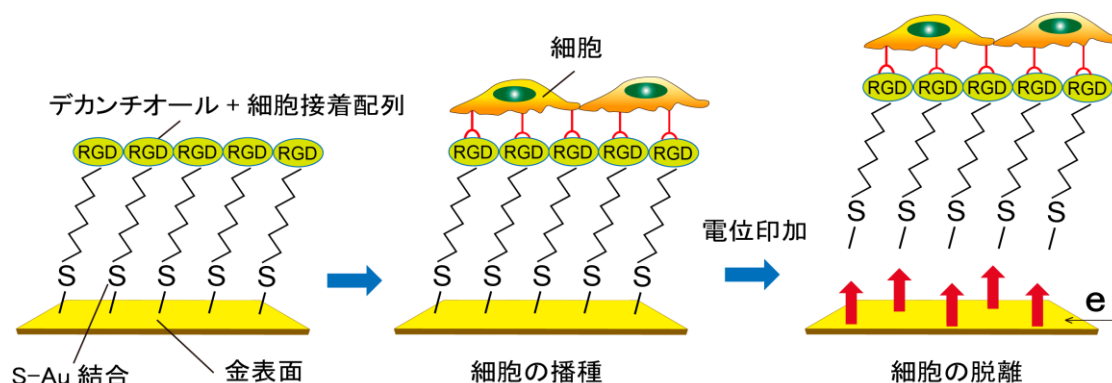
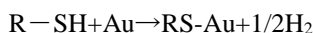


Figure 2.5 電気化学還元脱離を用いた細胞脱離の原理

ッシュもしくは、スライドガラスを用意する。その上に、金と自発的に結合することが分かっている、アルカンチオール分子を修飾する。この時、アルカンチオール分子はお互いに自己組織化単分子膜 (SAM)を形成する。



更にアルカンチオール分子の逆末端には、細胞と特異的に結合する RGD というアミノ酸の配列があり、細胞はこの RGD の配列を認識し、インテグリンを介して細胞が接着するという仕組みである[6]。細胞を回収する際には、金表面に負電位を印加することによって S-Au 結合が切断され、それに伴って、アルカンチオールの層は基板から剥がれ、アルカンチオール層に接着していた細胞を表面から剥がし回収することができる。アルカンチオールなどの SAM で被覆された金属電極をアルカリ性水溶液に浸して、負の電位を掃引すると、

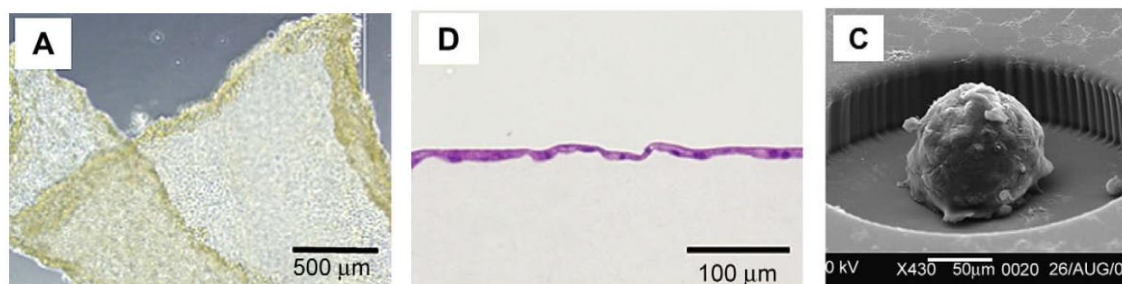
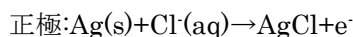
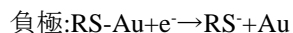


Figure 2.6 電気化学還元脱離を利用して回収した細胞シートと肝スフェロイド[6]

の還元反応が進行し、吸着していたチオール分子は還元されるとともに脱離することが知られている。この反応は、次に述べるサイクリックボルタンメトリーにより鋭い還元電流ピークとして観測される。この方法は、酵素処理法と比べて、細胞と基板間の間の接着のみ切断するので、細胞と細胞の間の接着は保たれたまま細胞を回収できるという利点がある。そのため細胞シートを回収することも可能である。

また、この方法は約 5 分間の電位印加によって細胞を脱離することができるので、従来の温度応答性ポリマーを使った細胞脱離に比べて大幅に時間を短縮することが可能である。短時間で細胞を脱離することの利点は大きく、細胞へ掛かる負担を最小限にすることはもちろんのこと、大量の細胞を処理する際にも有利になるので、ハイスループットなスクリーニングにも利用できる。また、電位を印加していない基板には全く影響を与えないので、金のパターンニングを形成すれば、位置選択的に細胞を脱離することができる[7-9]。

しかし、脱離に用いたアルカンチオール分子は本来生体内にある物質ではないので、回収した細胞を移植に利用とした際には、アルカンチオールが体に悪影響を与える可能性がある。そこで、新たにアミノ酸のみを用いたオリゴペプチドを介して細胞を接着させ、生体への適合性を高めかつ素早く脱離することができるペプチドを開発してきた。

2.3 オリゴペプチドのデザイン

2.3.1 本節の目的

本節では、このオリゴペプチドの評価として、金表面にどれだけの密度で金表面に接着し SAM を形成するのかを水晶振動子マイクロバランス法(QCM)によって明らかにする。またサイクリックボルタンメトリーCV 測定によって、どれほどの電位を印加すれば、このペプチドを脱離させることができるのかを測定し、その後このオリゴペプチドの上に細胞を播種し、電位印加時間と細胞脱離率の相関を測定することが本節の目的である。

2.3.2 SAM の形成

アミノ酸の配列によって、アルカンチオール分子のような自己組織化単分子膜を形成させるためには、各構造の分子構造を設計する必要がある。SAM はその役割によって大きく 3 つの部分に分けられる。1 つ目は、SAM と金属表面との結合させるための末端の部分、2 つ目は SAM の自己組織化能を大きく左右する中間部、3 つめは SAM に機能的な役割を付加する逆の末端部分である。1 の部分でよく用いられるのが、アルカンチオール分子でもあるような S-金属結合である。S と金属 (Au, Pt など) は自発的

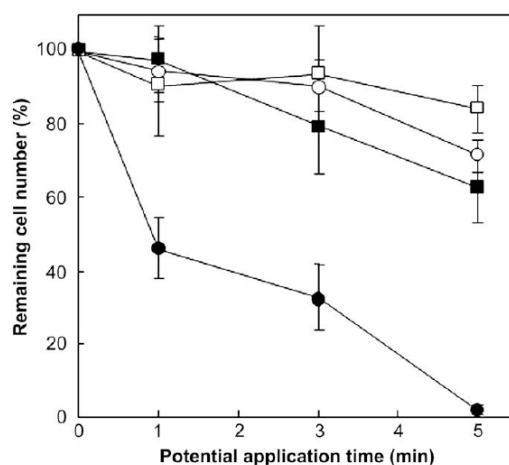


Figure 2.7 電位印加時間と細胞の脱離率の関係

に結合する性質をつため、**SAM** の形成に広く使われている。本研究で用いる物は、アミノ酸でなければならないので今回末端にチオール基を有するシステインを選択した。

2.3.3 自己組織化配列

2 つ目の部位は自己組織化の形成能や、その分子密度に大きく影響を与える。アルカンチオール分子では、ファンデルワールス力により比較的密な **SAM** を形成する。分子密度を高めることはタンパク質の非特異的な吸着を抑制する働きがあるので、設計では分子が密になるようにペプチドを設計したい。本研究で用いるオリゴペプチドでは、この部位にプラスのチャージを持ったリシンとマイナスのチャージを持ったグルタミン酸の配列を交互に並べることによって、分子層を密にすることとした。

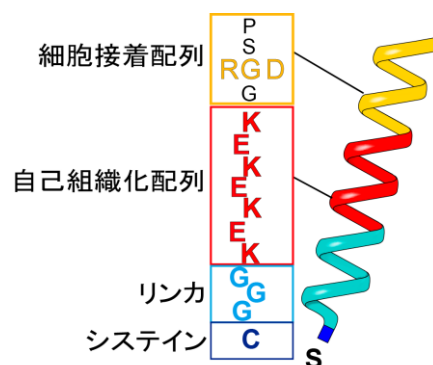


Figure 2.8 オリゴペプチドの配列

2.3.4 RGD 配列

3 つ目の逆末端は、**SAM** に機能的な機能を付加できる。本研究では **SAM** に細胞を接着させる必要が有るため、細胞接着性の配列である **RGD** の配列を組み込んでいる。細胞には特異的に細胞を認識する能力があり、特に、細胞の接着斑であるインテグリンは **RGD** という連続したアミノ酸の配列を認識し接着することができる。そこでこの特性を利用し、オリゴペプチドの逆末端には **RGD** 配列を挿入した。細胞が接着する際に関連する **RGD** の表面密度を末端に **RGD** を持つアルカンチオールの自己組織化単分子膜を利用して算出すると、**RGD** を有するアルカンチオールの存在比が 10^{-3} の自己組織化単分子膜上では細胞が接着してさらに伸展する。この値から、必要な表面 **RGD** 濃度は約 10^{10} 個/ cm^2 と算出される。つまり、細胞が半径 $10\ \mu\text{m}$ の円盤状の接着面を持っているとすれば、接着するために細胞一つ当たり 12,000 個の **RGD** が細胞の下に必要であるという計算となる。また、基板上的細部結合点 **RGD** が相互に 73 nm 以上離れていると、複数のインテグリンの細胞内付着タンパク間の共同作用が行えず、細胞は基板上に十分に接着できないことも示されている[10]。

2.3.5 設計したオリゴペプチドの配列

以上のような、知見を取り入れて設計したペプチドが **Fig. 2.8** である。配列 (CGGGKEKEKEKGRGDSP)。リンカとして GGG を選択した。これは、表面からの影響をなるべく打ち消しフラットにすることが目的である。また、ヘキサペプチドである GRGDSP は **RGD** 配列を有しインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ や $\alpha V \beta 3$ によって認識され細胞接着を誘導する。GRGDSP 配列は特に、フィブロネクチンとの細胞接着に使われるアミノ酸配列である。

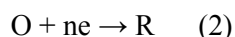
2.3.6 サイクリックボルタンメトリー

サイクリックボルタンメトリー (cyclic voltammetry, CV) は、多くの電気化学測定法の中で、電極表面あるいは電極表面近傍でどのような反応が起こっているかを最も直感的に把握できる方法の一つであり、手軽にすばやく多くの情報を得ることができる方法として汎用に用いられている。豊富な情報が得られる理由は、3つのパラメータ、電位、電流、時間の関係を一度に測定できるところにある。したがって、電子移動反応の速度、可逆性、化学反応との連携など、電気化学反応の抽象を取り出すことができる。つまりサイクリックボルタンメトリーは電気化学的に活性なレドックス化学種の電極反応の「初期診断法」として有用であり、他の電気化学的測定法と組み合わせて用いられる。CV では電極電位を初期電位 E_i からある掃引速度で反転電位 E_λ まで掃引したのち、折り返して再び E_i まで電位を戻したときに流れる電流を測定し、このとき得られる電流-電位曲線をサイクリックボルタモグラム (cyclic voltammogram) と呼ぶ。この図において負電流が観測される場合には還元反応が優先的に起こり、逆に正電流が観測される場合には酸化反応が起こっていることを意味している。また、CV は酸化還元反応などの平衡論的パラメータや拡散情報のみならず、電極反応や溶液内化学反応の様々な速度論的パラメータも鋭敏に反映する。溶液中の電気化学反応は、溶液に浸漬した電極表面において溶液中に存在する酸化還元種が電極と電子を授受することにより起こる。溶液中の酸化還元種が電極表面に輸送され、ある電位において電荷移動が生じ電流として観測されるとともに、生成物が溶液へ戻っていく。電流の大きさは電位の値、輸送や電荷移動の速度、物質の濃度などによって決まる (Fig. 2.9)。

ここで O : 酸化種、R : 還元種とし、O/R 系が可逆的な系であるとする、電極表面での O と R の濃度比は次のネルンストの式によって表される。

$$E = E^{0'} - (RT/nF) \ln([R] / [O]) \quad (1)$$

ここで、Fig. 2.9 の点 a の電位 E_i ($\gg E^{0'}$) から電位を負に掃引すると、



の還元反応が起こるため O の濃度は減少し、上式を満たすよう $[R]/[O]$ が変化する。これにより還元電流は増加し、点 c では $[R]/[O] = 1$ つまり $E = E^0$ となり、 $[O] = 0$ に近づくと $[O]$ の変化量は無視できるほど小さくなり、還元電流は点 d においてピークを迎える。また、このときの電流は掃引速度の平方根に比例する。さらに電位を負に掃引すると、点 e 近傍では還元電流は O の電極表面への拡散に支配され、掃引速度に無関係に電流が流れる。折り返し正方向への掃引についても同様である。

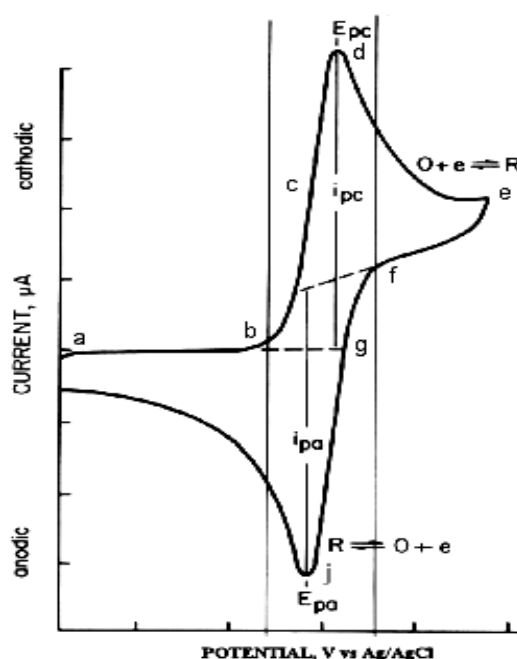


Figure 2.9 Methyl viologen (0.5 mM) のサイクリックボルタモグラム

(スキャン速度 20 mV/sec、電極表面積 0.6 cm²)

2.3.7 水晶振動子マイクロバランス法

水晶振動子とは、水晶の結晶を極薄い板状に切り出し、その両側に金属薄膜を取り付けたもので、それぞれの金属薄膜に交流電場を印加すると、ある一定の周波数 (共鳴周波数) で振動する性質を示す。

Fig. 2.10 に本実験で用いた QCM 電極とその原理を示す。QCM とは、この水晶振動子の圧電効果を利用して、金属薄膜上にナノグラム程度の物質が吸着すると物質の質量に比例して減少する共鳴周波数変化を測定できる微量質量分析法である。共鳴周波数の変化量と付着物質の質量との関係は、**Sauerbrey 式** と呼ばれる次式で表すことができる。つまり、周波数の変化量: ΔF を測定すれば、質量変化: Δm に換算することができる。

$$\Delta F = -2F_0^2/A(\mu_q \cdot \rho_q)\Delta m$$

ΔF ; 周波数の変化量

Δm ; 質量変化

F_0 ; 基本周波数(27 MHz)

A ; 電極面積(4.9 mm²)

μ_q ; 水晶のせん断応力

ρ_q ; 水晶の密度 2.65(g · cm⁻³)

高周波 QCM を用いることで-1 Hz=30 pg という高感度化を実現され、これまで変化量が小さく観察することが困難であった生体内の様々な分子（核酸、ペプチド、タンパク質、糖鎖、脂質単分子膜など）の相互作用の様子を経時的に周波数変化として検出可能となっている。

2.3.8 試薬及び装置

【装置】

- ・ QCM 装置 : AFFINIX - QN, Initium.
- ・ スパッタデポジション装置 : CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ・ ダイシング装置 : A-WD-10A, Tokyo seimitsu.
- ・ 電気化学測定装置 : AUTOLAB EN 55022, Eco Chemie.
- ・ Ag/AgCl 参照電極 : #2080A, HORIBA.
- ・ 位相差顕微鏡 : IX-71, Olympus.

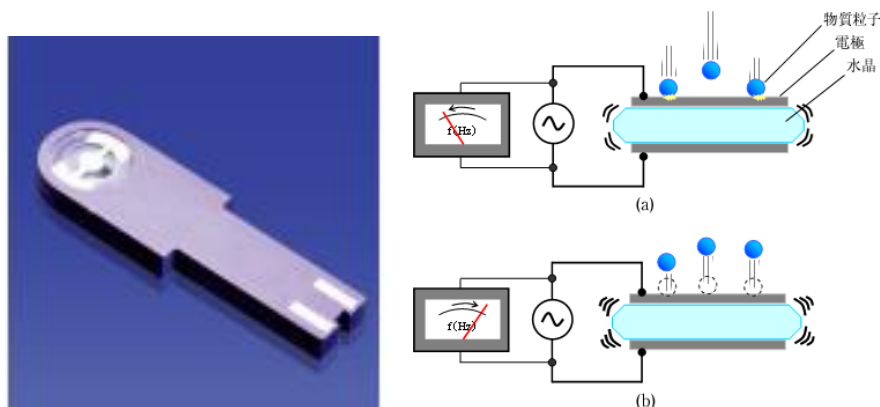


Figure 2.10 左: 本実験で用いた QCM 装置 右:動作原理

【試薬】

- ・ ガラス基板 : パイレックスガラス研磨品, ϕ 76.2 (3 inch) × 0.5 mm, Corning Japan.
- ・ オリゴペプチド (CCRRGDWLC) : Sigma Aldrich Japan.
- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 : Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.

- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・PDMS (Polydimethylsiloxane)：KE-1300T, ShinEtsu.
- ・PDMS 硬化剤：CAT-1300, ShinEtsu.
- ・リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO.

2.3.9 実験手順

【QCMによるオリゴペプチドの吸着量測定】

センサー洗浄

1 % SDS 溶液を含ませた綿棒でセンサー表面を優しく擦り洗いし、純水で洗浄することで物理吸着物質を除去した。さらに、混合比が濃硫酸 3：過酸化水素水 1 の piranha 溶液をセンサー部に滴下し、室温で 5 分間放置、純水で洗浄を 2 回繰り返し、化学吸着物質を除去した。

未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させたセンサーにチャンバーを装着し、本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min 程度に安定した時の周波数の値を未修飾時の周波数とした。

RGD ペプチドの修飾

センサー電極上にシステインとペプチドの溶液 (50 μ M RGD ペプチド/pure water) をそれぞれ 500 μ L 滴下し、30 分間放置した。その後、電極を純水で洗浄し、乾燥させた。

RGD ペプチドの吸着量測定

再びセンサーを本体にセットし、同様に安定した時の周波数の値を読み取った。周波数の値から、ペプチドの吸着量を計算し、定量評価した。

【CV 測定による還元脱離電位の測定】

基板洗浄

CV 測定用電極の表面を研磨剤とバフを用いて滑らかにする

RGD ペプチドの修飾

50 μ M (CGGGKEKEKEKGRGDSP)ペプチド溶液、に電極を 12 時間浸漬させた後、純水で洗浄し、窒素ガスで乾燥させた。

サイクリックボルタンメトリー

RGD ペプチド修飾基板を作用極、市販の Ag/AgCl 電極（内部電解液：飽和 NaCl 溶液）を参照極、白金板を対極とし、AUTOLAB に接続した。予め 20 分間窒素ガスをバブリングすることで溶存酸素を除去した 0.5 M KOH の電解液中で作用極に電位を掃引した。掃引条件は、電位のスイープ範囲を 0~-1.0 V(vs. Ag/AgCl)、速度を 20 mV/sec とした。

【電位印加時間による細胞の脱利率の変化の測定】

基板洗浄

24 mm×24 mm ガラス基板を純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

50 μ M RGD ペプチド溶液に基板を 12 時間浸漬させた後、純水で洗浄した。

基板の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を培地 EBM-2 に 5.0×10^4 cells/mL の密度で懸濁し、1 チップ当たり 0.5 mL 量、つまり 2.5×10^4 cells/chip の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で 37°C、5% CO₂-Air のもとで 12~15 時間培養した。

電位の印加

チャンバー内の培地を PBS(+)に交換し、基板を作用極、銀／塩化銀線を参照極、白金板を対極として三電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続して定電位-1.0 V を 1 分間隔で印加し顕微鏡で細胞数をカウントした。この操作を毎分繰り返し 7 分間観察を続けた。

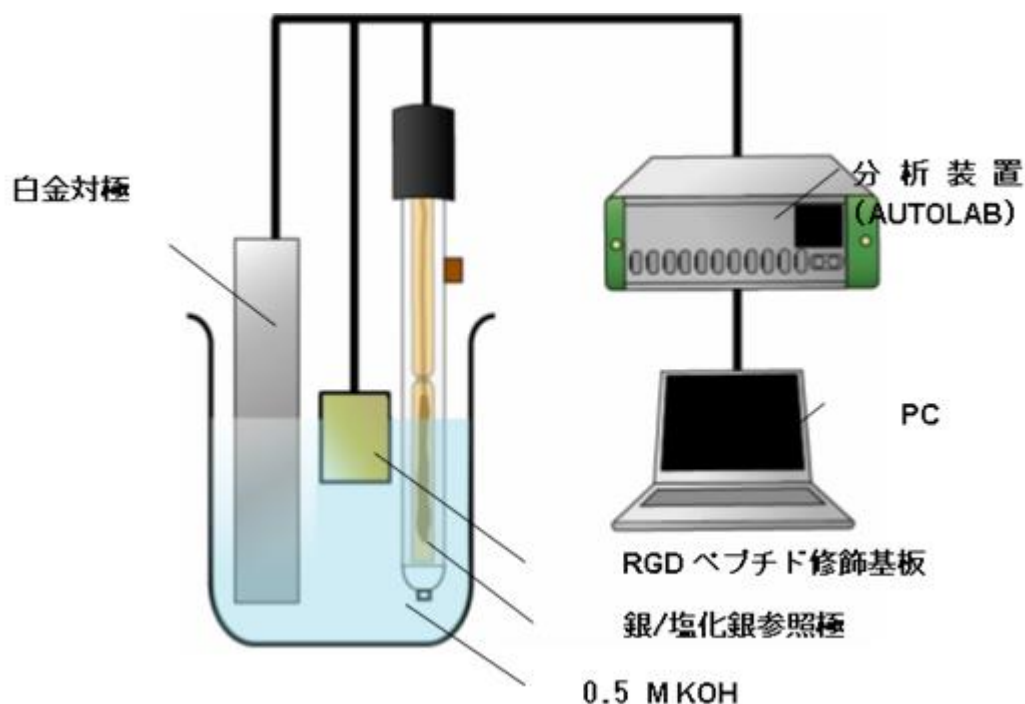


Figure 2.11 CV 測定の実験図

2.3.10 実験結果と考察

QCM によるオリゴペプチドの金への吸着量測定の結果を **Fig. 2.12** に示した。ペプチド溶液に浸漬後約 200-300 秒後には、吸着量は安定化し 10-20 分で一定値へと近づいた。実際の S-Au 結合は、浸漬後即座に起こり、結合から 20 ns ほどで SAM を形成するというシュミレーションの結果とも一致する。また、ばらつきはあるものの平均して 250 ng/cm^2 のペプチドが金表面に吸着していることが分かった。この結果から SAM の密度を表すと各オリゴペプチドの結合間隔は 1.1 nm 程度と見積もられる。前述のように RGD を持つオリゴペプチドの間隔が 73 nm 以上離れていると細胞接着に影響を及ぼすが、1.1nm はこれよりもはるかに密な間隔でオリゴペプチドが配列しており、十分な RGD の密度であるということが確認できた。

CV 測定によるオリゴペプチド(CG GGK EKEKEKGRGDSP)の還元脱離電位測定の結果を **Fig. 2.13** に示した。一度目のスキャンでは、-0.75V 付近から還元電流が流れ始め、鋭いピークが -0.85 V 付近に現れた。一方で、二度目のスキャンではピークの高さは減少した。このことからオリゴペプチドは -0.85V 以上の電位印加によって脱離し、一度の電位の掃引でほぼすべてのオリゴペプチドを脱離させることができた。今後の実験では、電気的な抵抗と気泡の発生を考慮しペプチドの脱離電位は一律に -1.0V を選択した。

オリゴペプチドの還元電圧が判明したので、オリゴペプチドの SAM の上に細胞を播種し接着させ、実際に、金表面に -1.0 V の電位を印加した。この時の電位印加時間と細胞の脱利率の変化について **Fig. 2.14** に示した。ペプチドを介した細胞は電位印加時間とともに細胞の接着率が減少していき約 5 分ほどの電位印加でほぼすべての細胞を脱離することができた。一方で、ペプチドを介して接着していない細胞はいくら電位をかけても細胞が脱離することはなかった。このことから、電位印加という操作だけ

で細胞は脱離することではなく、ペプチドを介した細胞と電位印加という操作を組み合わせることによって細胞を脱離することができるということを確認することができた。また、ペプチドを介したサンプルでも、表面を後述するハイドロゲル(GelMa)で覆い電位印加の後の支持体ごと転写をして回収した方がより短時間で細胞を脱離させることができること確認した。これは、主に、ハイドロゲルの剥離時の力学的な力によって細胞の脱離が促進されたか、細胞と培養基板との接着よりも細胞と GelMa の間の接着の方がより強くなったことで、細胞がより脱離しやすくなったのではないかと考えている。

2.3.11 本節のまとめ

本節の目的はまず QCM 測定によってオリゴペプチドの吸着量を測定することであった。測定の結果オリゴペプチドは 250 ng/cm^2 という密度で接着していることが分かった。また CV 測定によって、 -0.85 V 以上の電位を印加すれば、ペプチドを脱離させることができると分かった。今後の実験では、電気化学的に細胞を脱離させる際には電気抵抗を考慮して -1.0 V の電位を印加することにした。最後に、電位印加時間に伴う細胞数の変化を追跡することで、約 3-5 分ほどの電位印加でほぼすべての細胞を脱離させることができると分かった。

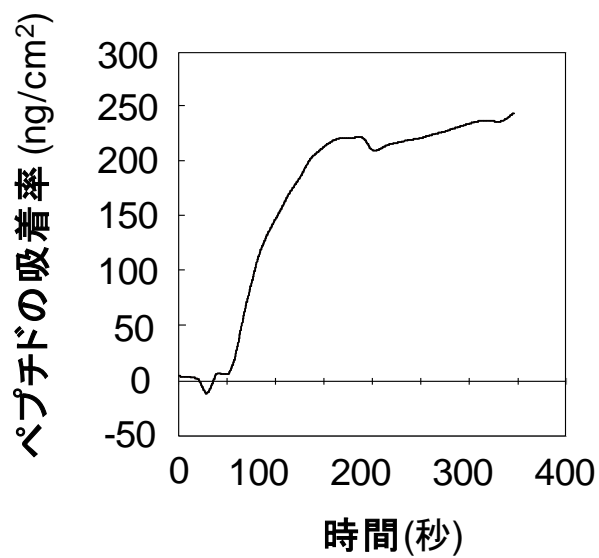


Figure 2.12 オリゴペプチドの吸着量の変化

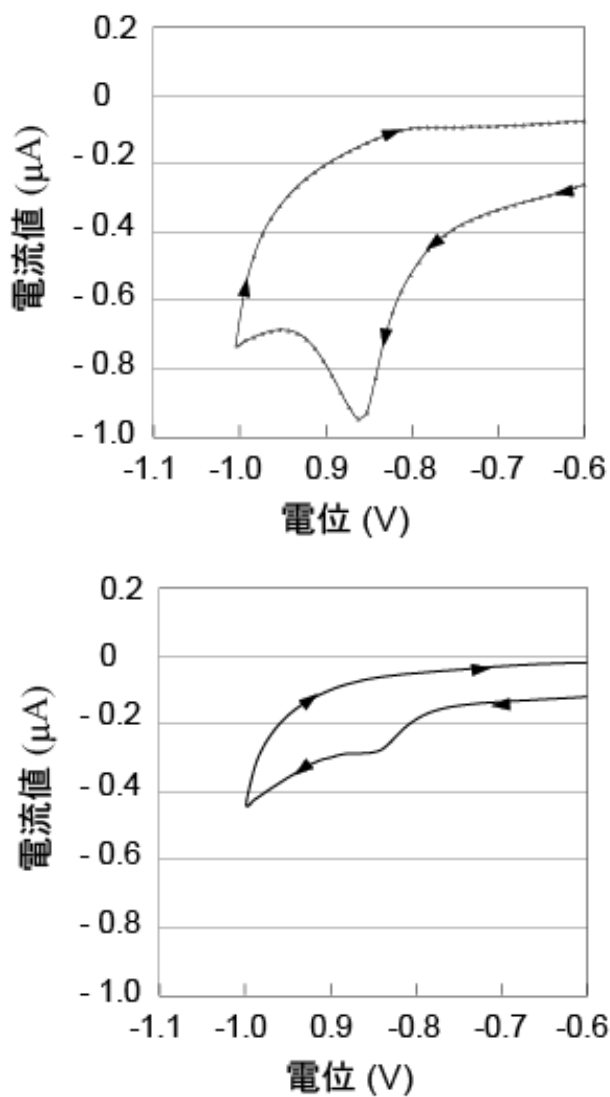


Figure 2.13 サイクリックボルタンメトリー
上:スキャン1回目 下:スキャン2回目

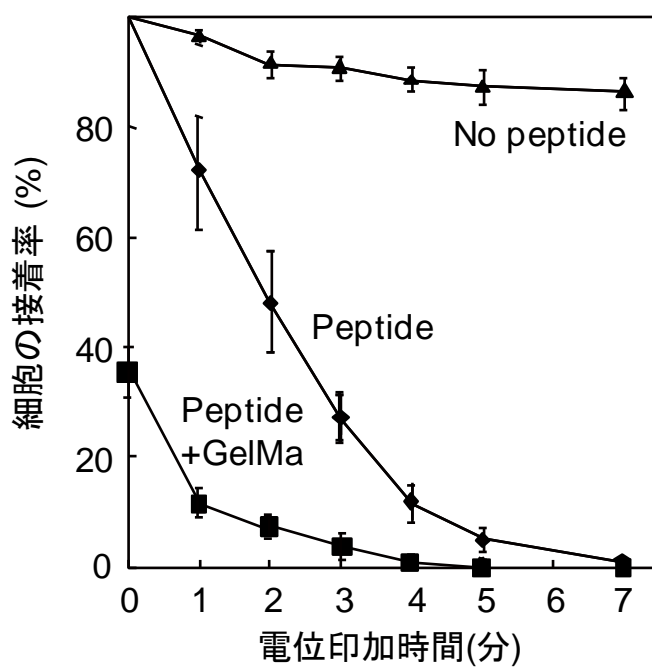
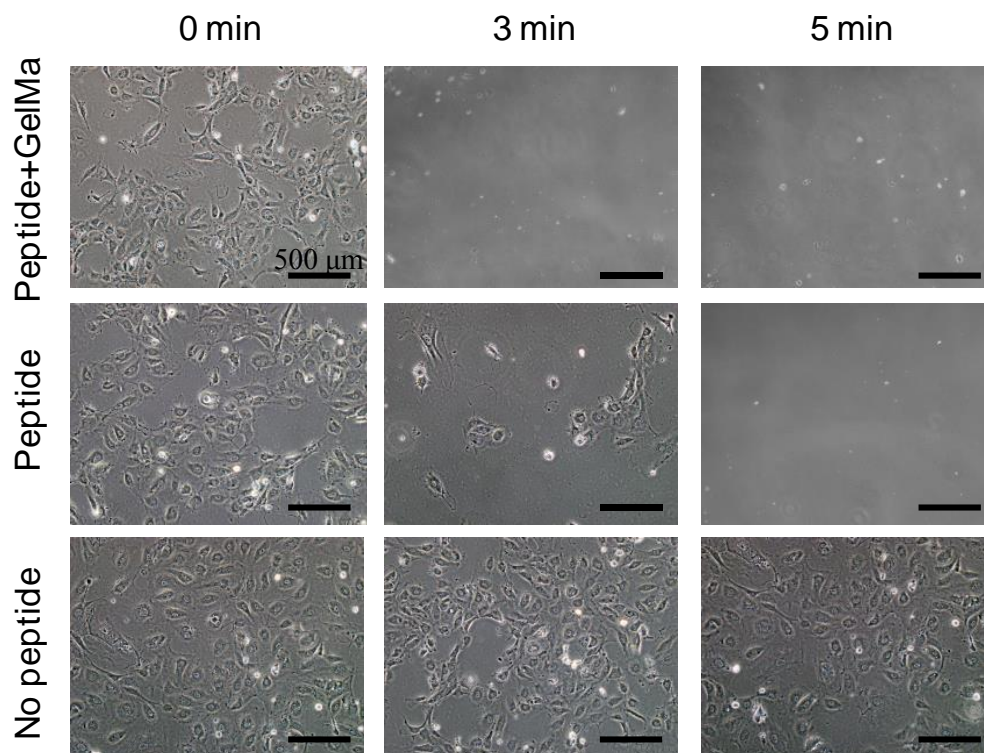


Figure 2.14 上:電位印加時間(1、3、5 分)の細胞接着率
下:定量評価のグラフ

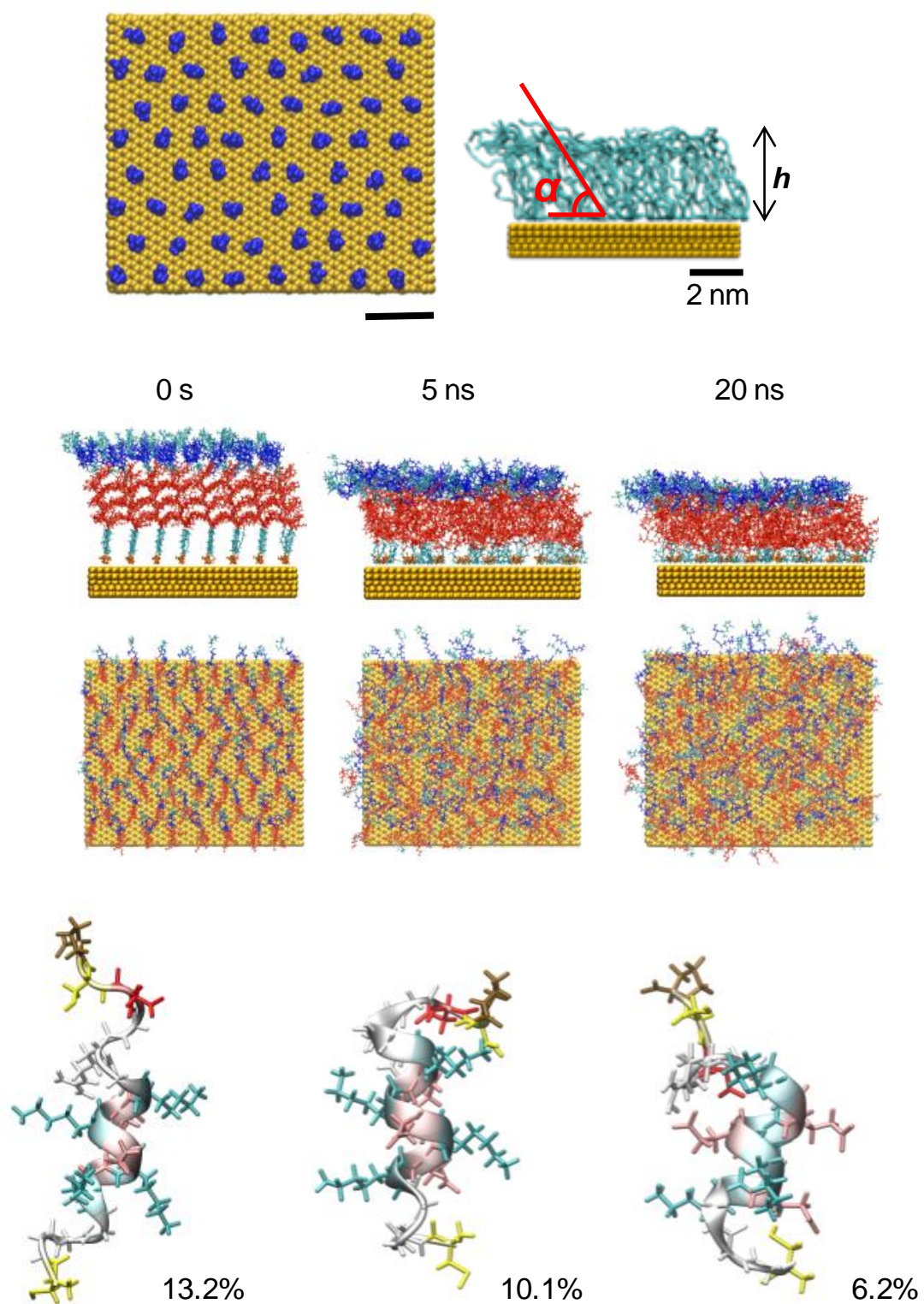


Figure 2.15 参考 シミュレーションによるオリゴペプチドの状態

2.4 光架橋性のゼラチンゲル

2.4.1 本節の目的

本節の目的は、短時間で3次元組織を作製する上で重要になる足場材料の選定を行った。具体的には、血管構造を保持する力学的強度を持ち、短時間でゲル化するハイドロゲルを創製することである。

2.4.2 細胞外マトリックス(ECM)

細胞外マトリックスとは、生物において、細胞の外に存在する超分子構造体のことである。細胞外の空間を充填する物質であると同時に骨格的役割、細胞接着における足場の役割、細胞増殖因子などを保持・提供する役割などを担っている。間質には、I型コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチンなどが多く存在しており軟骨では、II型コラーゲン、ヒアルロン酸、リンクタンパク質などがある。間質と上皮の間などに見られる基底膜にはIV型コラーゲン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンラミニニンなどが見られる。細胞

はこのようなタンパク質に、接着しながら生存している。生体外で、生体内の環境を実現しようとした際には、このようなタンパク質の中から、1つあるいは、複数のタンパク質を用いて足場材料とし、細胞の培養に応用する。最も広く用いられているのは、生体の主要なタンパク質であるコラーゲンである。

コラーゲン

コラーゲンとは真皮、人体、腱、骨、などを構成するたんぱく質の一つで、細胞外マトリックスの主成分でもある。ヒトでは、体内にある全タンパク質の30%ほどを占めており、細胞の発生、分化、形態形成において、非常に重要な生物学的な影響を及ぼしている[11]。これらのことから生体外でコラーゲンを細胞培養に利用することは有益であるとされている。実際に、ガラス培養皿上では不可能であっ



Figure 2.17 テクスチャーアナライザー

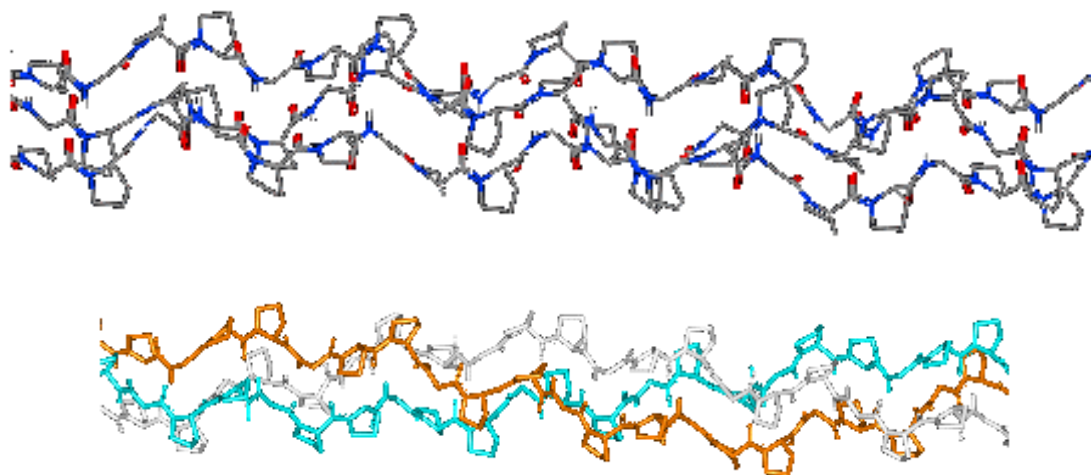


Figure 2.16 コラーゲンゲルの三重螺旋構造

た細胞増殖、長期培養、継代培養、細胞分化の誘導等がコラーゲンを基質として、行うことにより可能になっておりコラーゲンの有用性が証明されている。例えば、肝細胞を分化機能を維持したまま培養するのは困難であるが、コラーゲン上で培養すると 20 日間生存させることができたり[12]、本来、血清培地の条件下でしか細胞増殖を示さない乳腺上皮細胞を、無血清の条件下で培養することができホルモンや成長因子などの影響を *in vitro* でテストすることが可能[13]であり、*in vivo* に近い系で研究することができる。これらコラーゲンの性質は、コラーゲンに二つの大きな作用があるためとされている。その一つは、コラーゲングル内で培養した際に、細胞に基質膜を作らせる効果があることである。

コラーゲンの構造

コラーゲンは **Fig. 2.16** が示すように三重螺旋構造をしており、一つの鎖はアミノ酸が連なったペプチド鎖であり、-Gly-X-Y-という繰り返し構造を持っている。アミノ酸 1000 残基が結合したポリペプチド鎖が三本より合わさっている。コラーゲンの三重螺旋構造はアミノ酸同士の架橋構造によって結合している。もう一つは細胞の扁平化、進展による体積の増大を阻止し、細胞に元の形、体積を保たせることである。このコラーゲンを足場として使う場合、多くは pH を調整したコラーゲンを培養皿にコートし、30 分ほどインキュベートすることでゲル化させ、その上に細胞を播くことによって実現できる。もしくは、コラーゲングルの溶液に細胞を懸濁し、そのままゲル化させることでより生体内に近い環境で培養することができる。しかし、この 30 分という時間は細胞にとっては長く、その間に細胞が死んでしまうということも少なくはない。実際に、第一章で述べた 3 次元組織を構築するという設計論において、30 分という時間の間に細胞が不可逆的なダメージを負う可能性がある。

ゼラチン

コラーゲンは熱を加えると変性し、三重螺旋の構造が崩れ、一本鎖に分解される。これを抽出したものがゼラチンである。精製された純度の高いものは無味無臭。ゼラチンのコロイド水溶液は熱することによりゾル化して溶け、冷やすことによりゲルとなって固形化する性質を持つ。水分との混合割合により固形化の際の堅さを調節できる。

2.4.3 実験装置及び試薬

【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ・透析膜 MWCO12.000~14.000 Spectrumlabs.COM
- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・凍結乾燥機
- ・テクスチャーアナライザー

【試薬】

- ・ Gelatin from porcine skin (Sigma Aldrich)
- ・ Methacrylate anhydride (Wako chemical)
- ・ PBS (Gibco)
- ・ フォトイニシエーター Iragcure 2959 (Wako chemical)

2.4.4 実験手順

【GelMa の合成】

Gelatin の溶解

10 ml のリン酸緩衝液 (PBS) に 1 g の Gelatin を溶解させる。つまり Gelatin 濃度が 10%(wt%) の PBS を作製した。50℃で一時間かけて攪拌させ完全に溶かし込んだ。

Methacrylic anhydride の溶解

1 g の Gelatin に対して 0.8ml の Methacrylic anhydride を先ほどの溶液に加える。50℃で 20～30 分間攪拌させ溶液を均一にする。

PBS の希釈

PBS に対して四倍に希釈する。このとき加える PBS は 50℃前後に予め暖めておく。

透析

透析膜 MWCO12.000～14.000 を使い 7 日間透析を行う。この間は 1 日おきに水を交換する。

ろ過滅菌

溶液を 40～50℃に保ったまま 0.22 μ m でろ過滅菌を行い、雑菌を取り除く。

凍結乾燥

凍結乾燥機を用いて、溶液を分注したのち 7 日間 Freeze Dry を行った。

GelMa の保存

長期保存する際は-80℃で保存する。

GelMa のゲル化

凍結乾燥機で乾燥させておいた GelMa を PBS に再度溶解させる。GelMa が 5%となるように濃度を調節した。

フォトイニシエーターの添加

フォトイニシエーターである Iragcure 2959 を 0.1% 加え、50℃ に熱しながら完全に溶けるまで撹拌した。

光照射

作製した GelMa を Φ40mm ディッシュに約 1ml 流し込み、その後光照射装置で、約 50 秒間（出力 6.9 mW/cm²）照射しゲル化を行った。

GelMa の細胞毒性試験

ゲル化した、GelMa 上に血管内皮細胞 HUVEC を播種し（ 5.0×10^4 cell/dish）その後の、細胞の状態を生死染色によって確認した。

GelMa の光照射時間に伴う力学的特性の変化

光照射時間（5, 15, 30, 60, 90, 120 秒後）による弾性率の変化を測定するために、テクスチャーアナライザーを用いてグラフの立ち上がりからヤング率を計算した。

2.4.5 実験結果と考察

上記の合成手順により、GelMa を作製した。構造変化と架橋メカニズムについて **Fig. 2.18** に記す。光照射によつての、GelMa のゲル化画像を **Fig. 2.19** に記す。その結果、GelMa は光照射約 10 秒でゲル化をし始め、30 秒・50 秒でピンセットでつまむことのできるほどの硬さとなった。毒性試験の結果、GelMa 上に HUVEC を播種後 24, 48, 72 時間と観察したところ、通常通り増殖していき、72 時間後の生死染色でほぼすべての細胞が生存しているという良好な結果を得ることができた (**Fig. 2.20**)。また、光照射時間の変化によるヤング率の変化を **Fig. 2.21** に示した。光照射 5 秒では、ゲルは柔らかく 0.15 kPa 程度ととても低い値となった。一方で照射後 15 秒では、ゲルの重合は開始しヤング率は 0.2 kPa となった。またその後は、直線的にヤング率は上昇していくという結果となった。このことから、ゲル化には最低でも約 10 秒の光照射が必要であると分かった。また、このゲルの弾性率はコラーゲンゲルよりも高い値を示し、当初の目的であった、コラーゲンゲルより堅牢なゲルを作製するという目標を達成することができた。なお今回は GelMa の容量を 1ml として実験を行ってきたが、この容量や体積によって、光照射時間とヤング率との関係性は変化すると考えられる。一般に、光装置から離れれば離れるほど、エネルギーは弱くなるため、より長い時間光を照射しなければならない。GelMa は、生体適合性の材料として使用されていて、既に動物実験によって、高い生体適合性特性を示している材料である。本研究では、コラーゲンゲルに似たその高い生体適合性と短い時間による光照射という利点を最大限に利用できるのもので、後述する血管構造作製への足場材料として最適であると考えた。そのため、本論文を通して、GelMa を用いて実験を進めることとした。

2.4.6 本節のまとめ

本節では、光架橋性のゼラチンゲル(GelMa)の合成、毒性試験、光照射によるヤング率の評価などの

基礎評価を行った。それぞれの基礎評価において、高い生体適合性と、短時間でのゲル化能を示し、この光架橋性のゼラチンゲルが今後の実験である血管構造作製において最適な材料であると決定付けることができた。

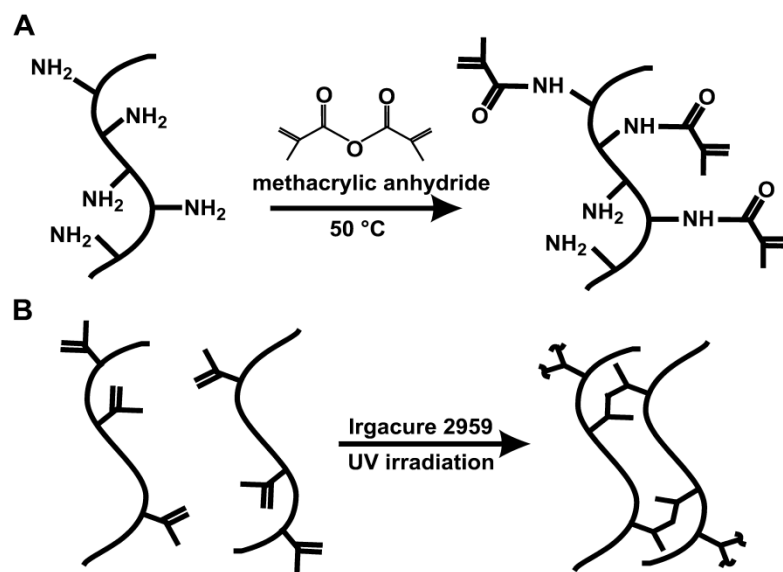


Figure 2.18 重合メカニズム

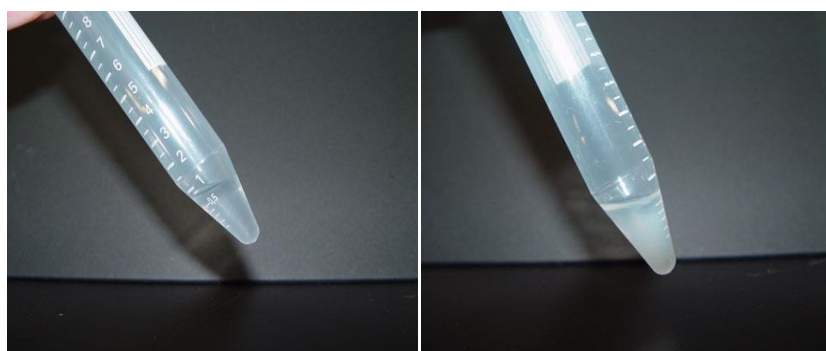


Figure 2.19 GelMa のゲル化の様子

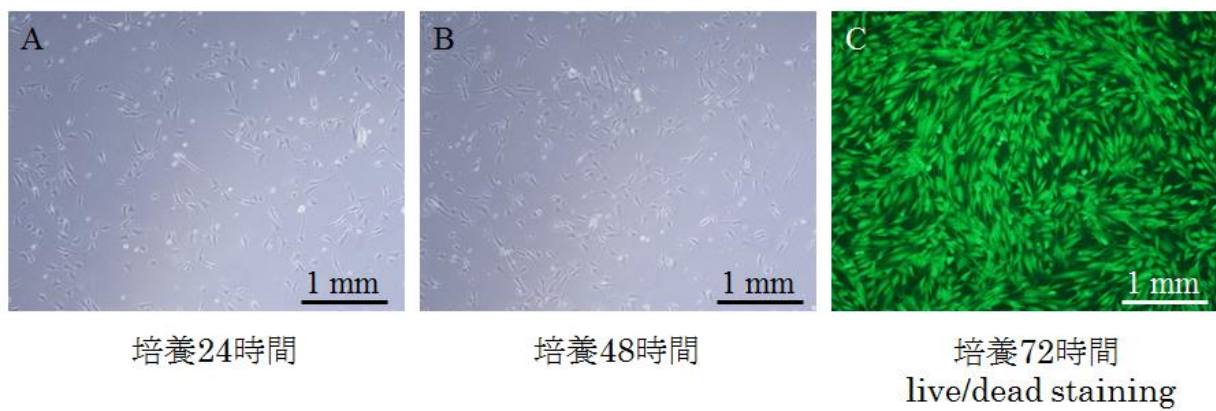


Figure 2.20 GelMa 上の HUVEC の状態変化(24, 48, 72 時間後)と生死染色(緑:生細胞、赤:死細胞)

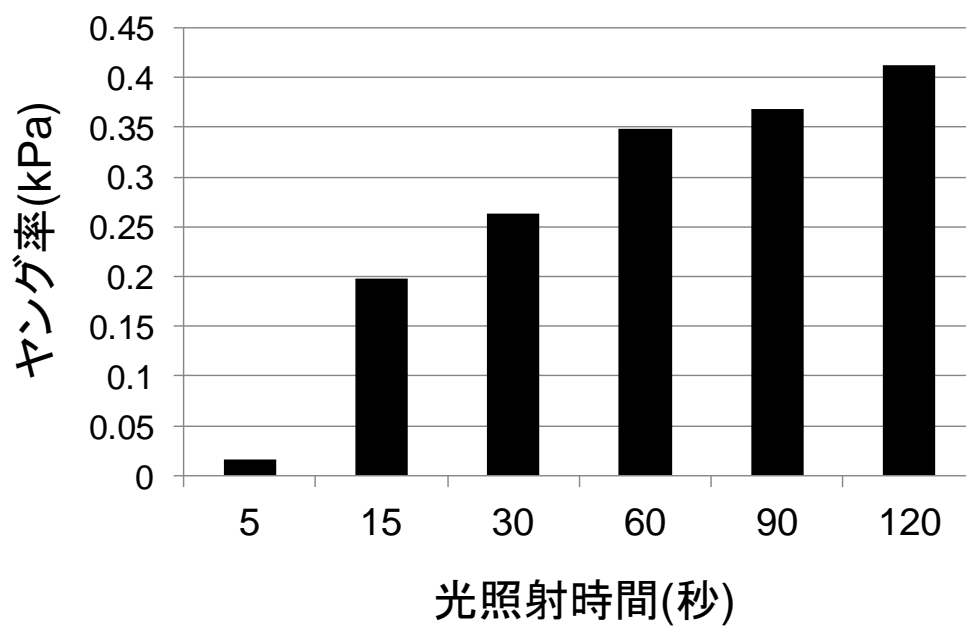
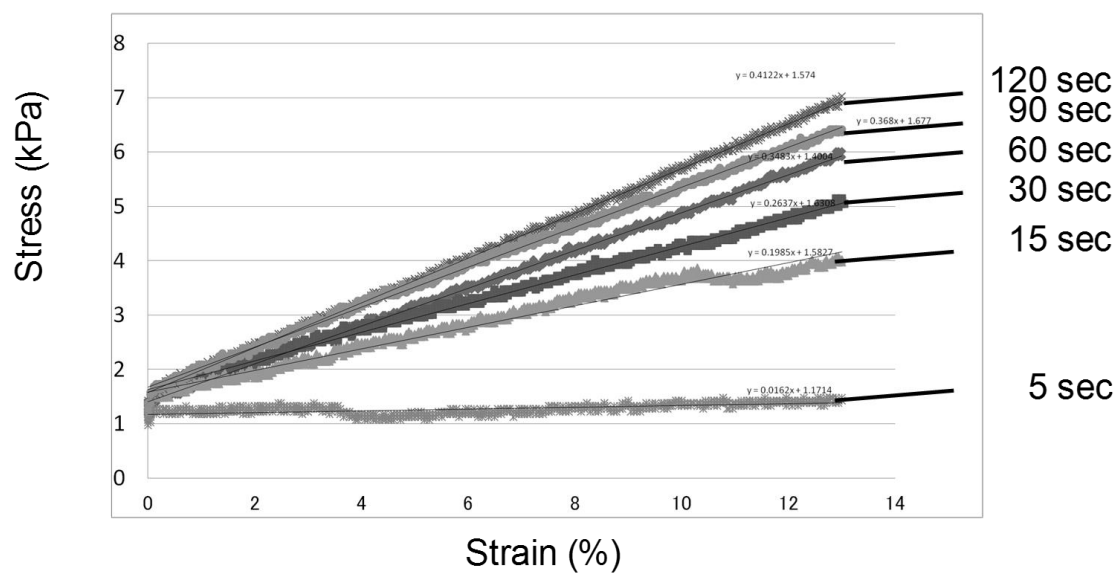


Figure 2.21 光照射時間に伴うヤング率の変化
(5,15,30,60,90,120 秒)

2.5 光架橋性のゼラチンゲルを用いた血管構造の構築

2.5.1 本節の目的

本節の目的は、ここまで検討してきた、電気化学還元脱離を用いた細胞回収と光架橋性のハイドロゲルを組み合わせることで血管模倣構造を作製することに有る。電気化学を用いた細胞転写はその一つの特徴として、どんな形の表面にも適応できる点がある。例えば、金の表面が凸凹していれば、細胞も凸凹とした細胞シートを作り、転写できる細胞シートも凸凹している。この特性を利用し、本節では、金表面として円柱状のガラスキャピラリーに金をコートして、これから細胞を脱離させることで、円柱状の血管類似構造が作製出来るのではないかと考えた。**Fig. 2.22** がその実験手順である。そして作製した血管構造に培地を流しながら培養し、長期間培養することで、光架橋性の耐久性も評価することとした。この方法は、3本の血管構造を独立した金線を等間隔に並べることによって、3本の並列血管構造を作製する。一方で、より多くの血管構造を一度に規則配置するには、この方法だけでは限界があり方法が必要であろう。そこで、**Fig. 2.23** に示すように、予め近ニードルが等間隔配置されたマルチニードルを鋳型として用いることで、9本の血管構造を一度に作製する手法を考案し、実際に血管構造を作製した。

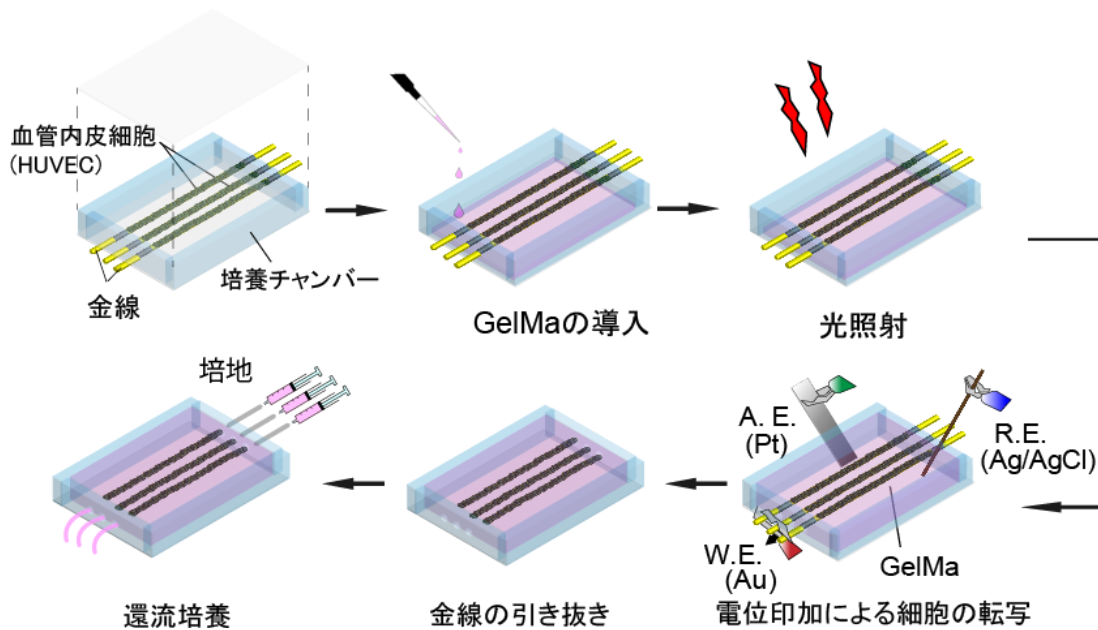


Figure 2.22 3本血管構造作製手順

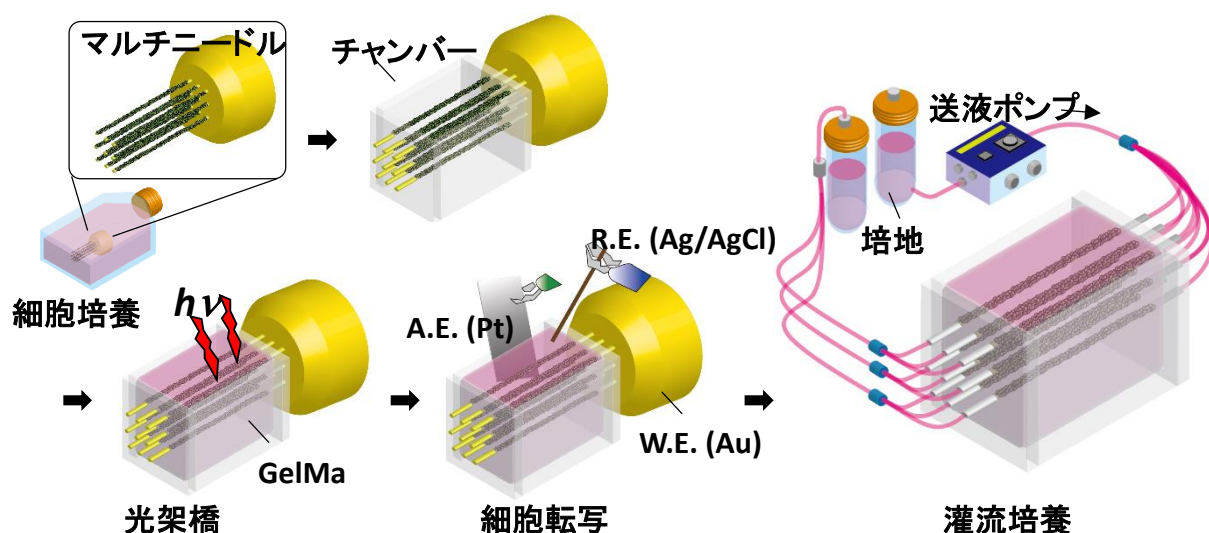


Figure 2.23 マルチニードルを用いた複数本の血管構造作製手順

2.5.2 実験装置及び試薬

【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・ポテンシostat/ガルバノスタット：HA-151, Hokuto denko.
- ・Ag/AgCl 参照電極：#2080A, HORIBA.
- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・Micro Syringe Pump：CT-1, DR-12 V, AS ONE.
- ・レーザー加工機：Laser PRO C180, GCC Taiwan.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・凍結乾燥機

【試薬】

- ・ガラスキャピラリー：φ 600 μm × 3.2 cm, Hirschmann Laborgeräte, Germany.
- ・オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP)：Sigma Aldrich Japan.
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・Ham-F12 粉末培地：Invitrogen.
- ・GelMa (前節で作製).
- ・アクチン染色試薬：Rhodamine Phalloidin, Sigma.
- ・核染色液：DAPI, Sigma.
- ・非接着性 Dish 住友ベークライト セルタイト X

2.5.3 実験手順

[RGD ペプチド修飾金線の作製]

Case1. ガラスキャピラリー洗浄

30~50 本のガラスキャピラリーを PDMS で作製した土台に垂直に差し込み、純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

Case2. マルチニードル洗浄

ステンレス製のマルチニードルを 50 mM KOH+25% H₂O₂ 溶液に 10 分間、浸漬し表面の汚れやタンパク質を取り除いた。

Case1. ガラスキャピラリーの Au/Cr 層のスパッタ

PDMS の土台にガラスキャピラリーを差し込んだ状態で、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分 30 秒間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 3 分間スパッタした。

Case2. マルチニードルの Au/Cr 層のスパッタ

マルチニードルを、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Au を 9 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

50 μ M RGD ペプチド溶液にガラスキャピラリーもしくはマルチニードルを一晩（12~15h）浸漬させた後、純水で洗浄した。

[金線培養]

金線の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金線をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

金線を非接着性ディッシュに 5~10 本もしくはマルチニードルを 1 本入れ、EBM-2 に 7.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁した HUVEC を 1 ディッシュ当たり 2 mL 量、つまり 1.5×10^5 cells/dish の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で 37°C、5% CO₂-Air のもとで、金線周囲を完全に覆うまで、3~4 日間培養した。

[血管様構造の作製]

培養チャンバーの作製

厚さ 2 mm のアクリル板をレーザー加工機で指定の形状に切断し、接着剤（アクリサンダー）を用いて、培養チャンバーを作製した、細胞に害を与えないように、80℃オーブンに数十分入れて、接着剤を完全に乾燥させた。更に、純水に一晩漬けた後、70%エタノールで滅菌して使用した。

金線の固定

培養した金線を PBS 溶液に一度漬けてから、表面の細胞を乾燥させないように、アクリルの培養チャンバーに 3 本固定した(**Fig. 2.22**)。このとき、細胞を傷つけないように注意しながら差し込んだ。

GelMa 溶液のゲル化

GelMa 溶液をチャンバー内に 0.5ml-1ml を流し入れ UV 光を 5.0mW/cm² の出力で 60 秒×2 当ててゲル化させた。

電位の印加

金線を作用極、銀/塩化銀線を参照極、白金板を対極として、GelMa 内に差し込むことで三電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 V を 5 分間印加した。

血管様構造の形成

Case1 電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、チャンバーから金線を 3 本とも丁寧に真っ直ぐ引き抜くことで、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

Case2 電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、チャンバーからマルチニードルを引き出しそれを送液口に設置する。このようにして、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した 9 本の血管様構造を形成した。

血管構造の送液培養と観察

培地をシリンジポンプで送液しながら培養し、経時的に血管構造を位相差顕微鏡で観察した。

[血管様構造の核・アクチン染色]

ストック溶液

試薬 Rhodamine Phalloidin を MeOH に溶解し、濃度を 14 μM に調整した。

染色溶液

1% BSA を含む PBS 溶液にストック溶液を加え、濃度を 100 nM とした。

染色方法

- 1)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 2)固定化：4%パラホルムアルデヒド (in PBS) にてサンプルを固定化した。(室温、10 分)
- 3)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 4)透徹：0.1% Triton X-100 (in PBS) にてサンプルを透徹した。(3~5 分)
- 5)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 6)アクチン染色：Rhodamine Phalloidin 染色溶液にてサンプルを染色した。(室温、20 分)
- ※このとき、サンプルを暗室に置くか、アルミホイルで覆った。
- 7)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 8)核染色：DAPI 染色液にてサンプルを染色した。(室温、5 分)
- 9)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 10)観察：蛍光顕微鏡により観察した。

2.5.4 実験結果と考察

まず、金線上への HUVEC の接着と培養を行った。その結果、血管内皮細胞 GFP-HUVEC は金線の周りを覆うように接着し、培養から 3-5 日で金線を隙間なく覆う程に至った (**Fig. 2.23-d**)。SEM を用いた観察では、HUVEC が金線上に隙間なく覆う様子が観察できた。その後、アクリルの培養チャンバーを用いて、金線を約 500~600 μm の間隔で並列に 3 本配置、もしくはマルチニードルを配置し、電位を印加して引き抜いたところ、互いの間隔を保ったまま並列した 3 本の血管様構造が形成された (**Fig. 2.24**)。送液培養を行うと、互いの間隔が崩れることなく、その構造を維持したまま培養可能であることがわかった。これにより、微小間隔で配置した複数本の血管様構造を作製することが可能であることが示された。

さらに培養を続けると 1 ヶ月程度その構造を維持できることが分かり、内皮細胞 1 層ながら、細胞の増殖能が失われずに維持されていることが示された。この手法の特徴は作製時間の短さにある。ハイドロゲルのゲル化に約 2 分、細胞転写に 5 分全体として少なくとも 10 分以内にはこれらの構造を作製できるため、たとえゲル内に高密度の幹細胞など酸素消費量の多い細胞を充填したとしても、酸素枯渇を起こす前に送液を開始できる。つまり、この方法は 3 次元組織を作製するための血管構造の導入方法として非常に有用な方法であるといえる。

2.5.5 本節のまとめ

本節で作製したアクリル培養チャンバーを用いることで、微小間隔で並列に配置した血管様構造を作製することが可能であった。また GelMa 中に構築した血管は、血管構造を三週間以上維持することができた。また、マルチニードルを用いれば、等間隔配置された 9 本の血管構造を一度に、作製できることを示した。

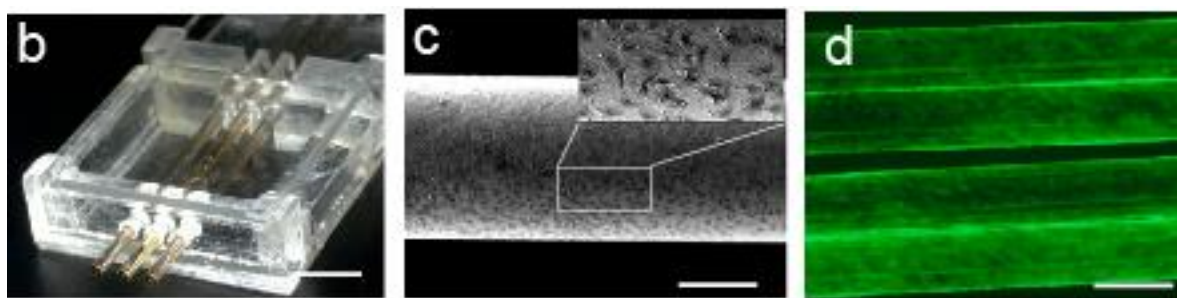


Figure 2.24 アクリル製の培養チャンバー(b) 培養 3-5 日後の金線上の GFP-HUVEC (d)

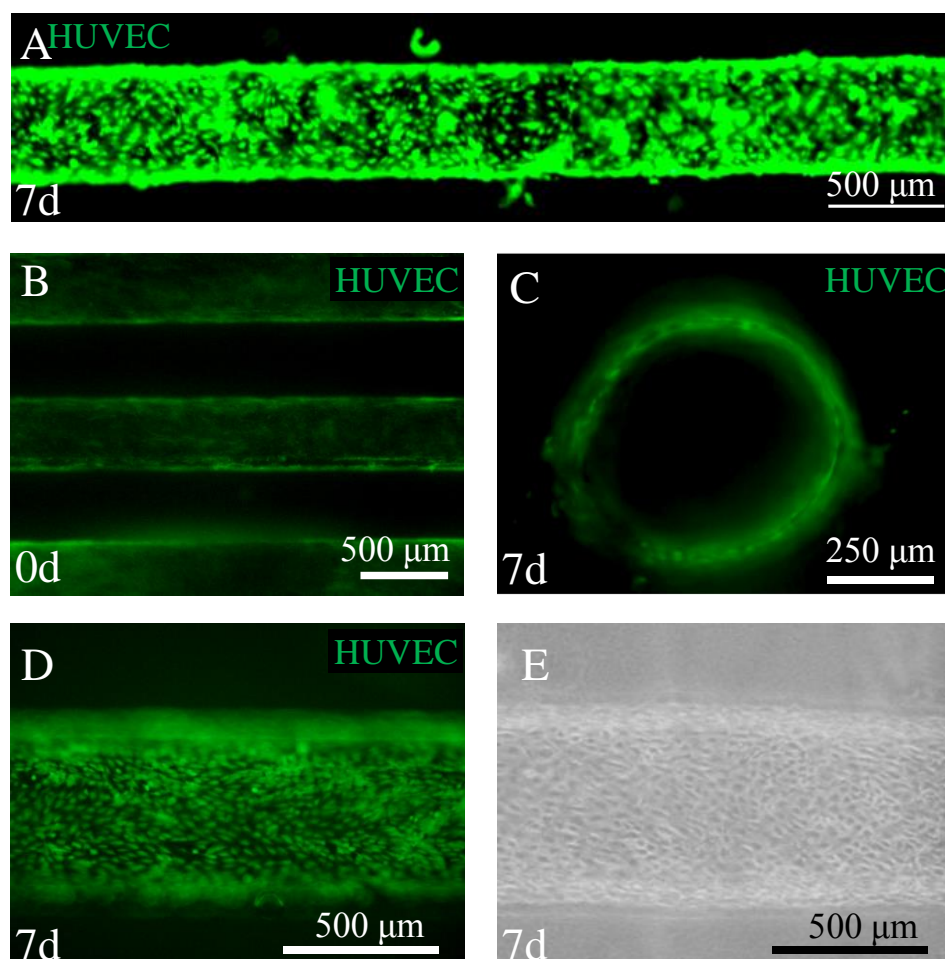


Figure 2.25 GelMa 中に作製した血管構造. (A,B) 1 本血管構造の断面図(C)1 本の血管構造の拡大図(D, E)

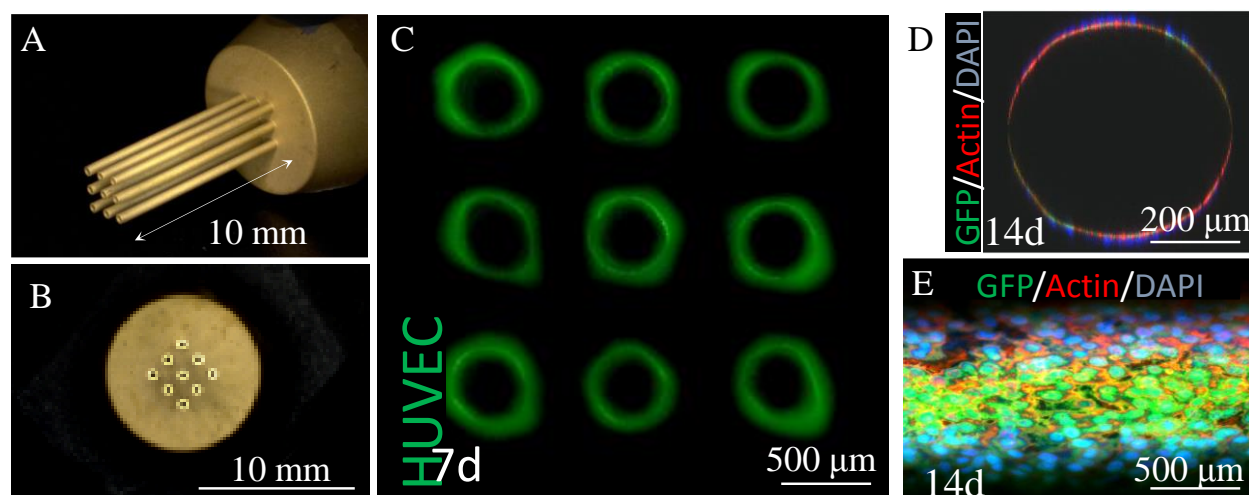


Figure 2.26 (A, B) マルチニードルの外観図、(C)9本の並列した血管構造、(D, E) 2週間後の血管構造の断面図と拡大図

2.6 送液培養において送液速度が血管内皮細胞に与える影響

2.6.1 血液循環

生体内の血管の中には絶えず血液が流れ込み全身へ酸素や栄養分、老廃物や体温、水分を運んでいる。血液は心臓から送り出された後、大動脈から各種組織へ流れ込みその後、静脈へと流れ心臓へと戻る。その量は一分間に 4-5L もの血液を送り出している。肝臓には、そのうちの 1-1.5L/min 程度で血液が流れこむ。血管の内表面を覆っている血管内皮細胞は、常にこの血液と接触し、各組織へと血液を送り込む役割を担っているが、自分自身も血液から酸素や栄養分を補給し、恒常的に血管を保っている。つまり、血流が止まることは、組織の壊死のみならず血管内皮細胞の壊死をも引き起こす。

2.6.2 送液培養と静置培養

前節ですでに、送液培養による血管構造の培養を行なってきたが、ここでもう一度送液培養の重要性について触れておきたい。一般に生体外で、細胞を培養する際には、ディッシュ上に細胞を播種しその後その細胞表面を覆うように、培養液を流し込んで培養する。一般に、この方法を静置培養と呼び、最も簡単でポピュラーな方法である。この方法は単純拡散のみで酸素や栄養分を細胞に運ぶ。これに対して、静置培養では酸素や栄養分の供給が追いつかないほど大きな組織を培養する際には強制的にまたは連続的に培地を交換できる送液培養が好まれる。この方法では、シリンジポンプやペリスタティックポンプ **Fig. 2.27** を用いて培地を組織内に送り込み連続的に培地交換をすることで、常に新鮮な培地を組織に送り込むことができる。本研究の実験系でも、血管構造をしていることや組織に他の細胞を加えた際に十分な酸素や栄養分を供給するために送液培養を行う。

2.6.3 送液速度と細胞への養分供給

送液培養をする際に、重要となってくるのが培地をどれぐらいの速度で流しこむかという送液速度である。送液を行った際の培地の拡散は移流拡散方程式（式 1）に従う。

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} + \nabla \cdot (c\phi) = \nabla \cdot (D\nabla \phi) \quad \text{式 1}$$

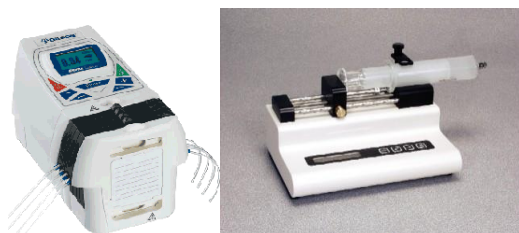


Figure 2.27 左：ギルソン社のペリスタルティックポンプ『ミニパルスエボリューション (MINIPULS Evolution)』 右：KDS 社マイクロシリンジポンプ

つまり拡散の速度は、単純拡散の速度と送液速度との和で決まる。したがって送液速度を早めれば早めるほど培地の拡散は増え、単位時間あたりにたくさんの酸素や栄養分を供給することができる。しかし、送液速度を早めれば早めるほど、血管内の圧力が上昇する。常に、培地と触れ合っている血管内皮細胞にとって送液速度が上がることはせん断応力が増すことになり、過剰なせん断応力は細胞へのダメージに繋がる。したがって適切な速度で培地を流す必要がある。一般にヒトの正常な血圧は、85-130mmHg である。

2.6.4 本節の目的

以上のことより、本節では本実験系での適切な送液速度を決定するために 0, 1, 10, 100 μmin という 3 つの異なる送液速度で送液培養を行い、その際の血管内皮細胞に与える影響を、細胞の増殖率や接着率の観点から評価する。

2.6.5 試薬及び装置

以下に実験に用いた試薬及び装置を示す。特に記述のないものは、全て市販品を使用した。試薬の調製には、脱イオン蒸留水を用いた。

【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・ポテンシオスタット／ガルバノスタット：HA-151, Hokuto denko.
- ・Ag/AgCl 参照電極：#2080A, HORIBA.
- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・Micro Syringe Pump：CT-1, DR-12 V, AS ONE.
- ・レーザー加工機：Laser PRO C180, GCC Taiwan.

【試薬】

- ・ガラスキャピラリー： ϕ 600 $\mu\text{m} \times 3.2$ cm, Hirschmann Laborgeräte, Germany.
- ・オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP)：Sigma Aldrich Japan.
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・Ham-F12 粉末培地：Invitrogen.
- ・Phorbol 12-myristate 13-acetate：PMA, Sigma-Aldrich.
- ・アクチン染色試薬：Rhodamine Phalloidin, Sigma.
- ・核染色液：DAPI, Sigma.
- ・非接着性 Dish 住友ベークライト セルタイト X

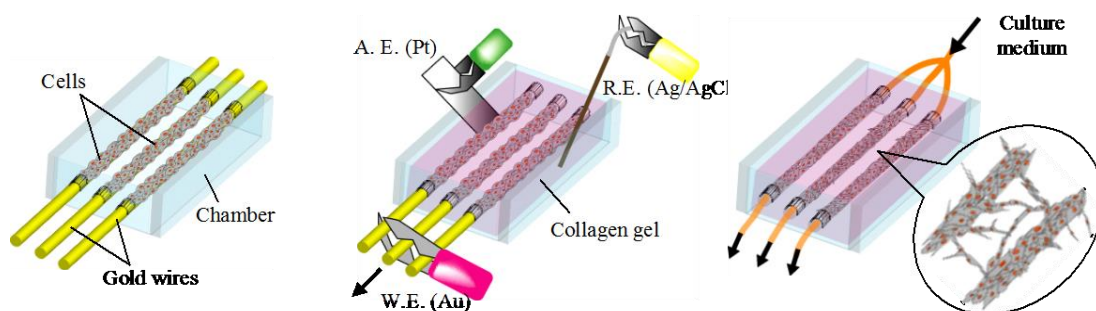


Figure 2.28 血管構造の作製手順

2.6.6 実験手順

血管様構造の形成

前節と同様の方法で、電気化学的な原理に基づいて、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した(Fig. 2.28)。

シリンジポンプの接続と培地の送液

作製した血管構造にシリンジポンプを作製し、異なる送液速度で培養を行った。各時間 (0, 1, 10, 100 μL) に位相差顕微鏡で観察し、細胞の状態をモニタリングした。

2.6.7 実験結果と考察

異なった送液速度で、血管構造を培養した結果を Fig. 2.29 に示す。送液速度 0 μL (A)つまり、送液を全くしない状態では、細胞転写から 12 時間後の時点ですでに、細胞の壊死が始まり所々細胞が剥がれている様子が観察できる。また、送液速度が上がるごとに細胞の状態は良くなっている。1 μL では若干の壊死が見られるものの、10 μL では、ほぼすべての細胞が良好に保たれ、血管構造を安定して維持できることが分かった。一方で 1000 μL 以上の送液速度で送液してしまうとせん断応力がかかりすぎ、反対に細胞が剥がれ落ちてしまうという結果になった。一般に、生体内の毛細血管は 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度の速度で血液が流れている。しかし、今回作製してきた血管は生体とは違い、血管内皮細胞一掃のみによって支持される血管構造であるため、血管内皮細胞が剥がれるといった結果となった。今後、血管内皮細胞以外の細胞例えば、平滑筋細胞や、周皮細胞などの細胞も加えて血管構造を作製できれば、更に速い送液速度にも耐えうる血管構造が構築できるのではないかと考えている。

2.6.8 本節のまとめ

本節では、送液速度の違いによる HUVEC への影響を経時的に観察することが出来、送液速度の最適な条件を決定することができた。今後の培養系では、10 μL という送液速度を基準として、送液培養を進めて行く事とした。

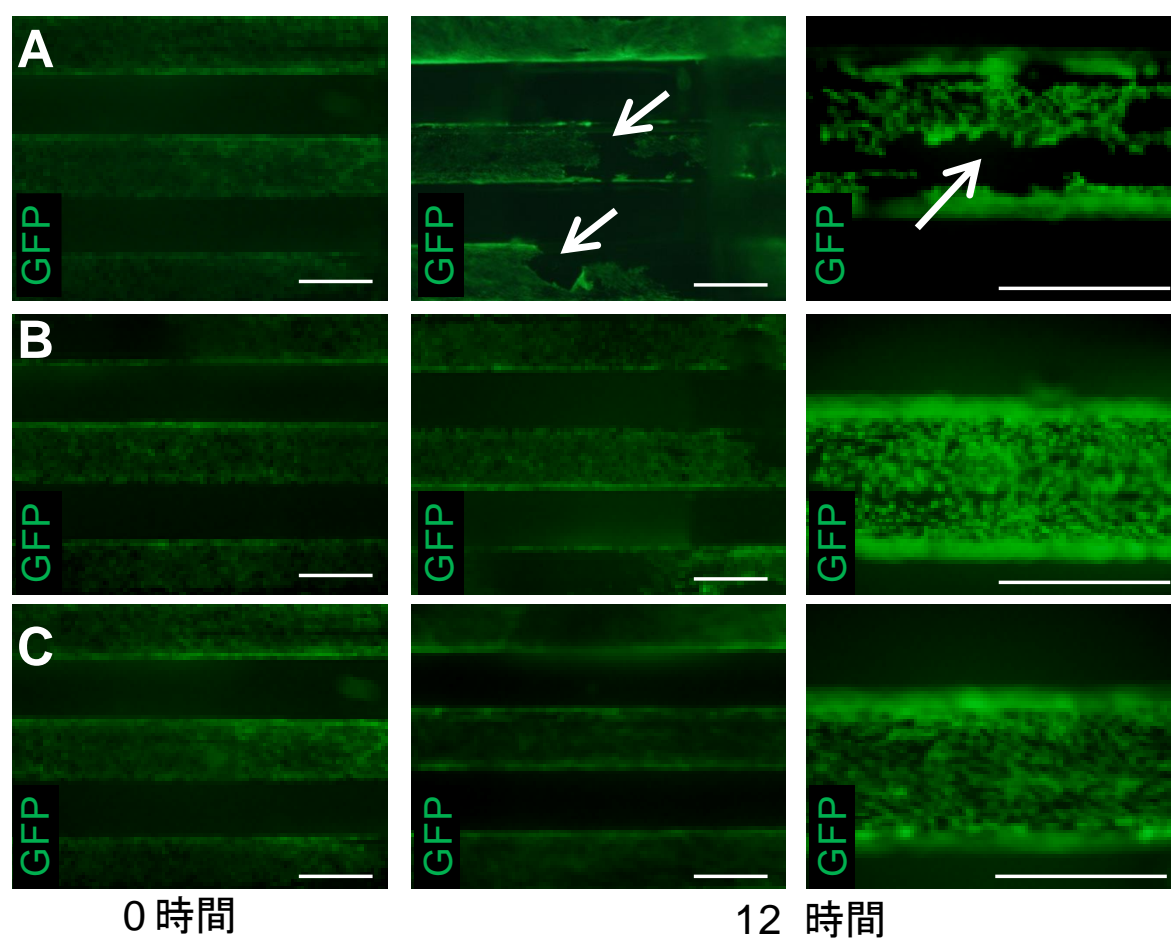


Figure 2.29 送液速度が血管構造を覆う HUVEC に与える影響 (A) 送液速度 0 μl (B) 送液速度 1 μl (C) 送液速度 10 μl 白矢印:壊死している様子が観察できる

2.7 送液速度に血管内皮細胞の配向性

2.7.1 本節の目的

本節の目的は、高速フーリエ変換による画像解析を用いて、送液培養時の配向性の変化を測定することである。配向性の変化を測定することによって、間接的に、細胞間の接着を測定し血管内皮細胞に対して物理的な刺激の有無やその影響を測定する。

2.7.2 細胞の配向性

血管内皮細胞は、細胞の片側は ECM に接着し、もう片側は血液に接触する特殊な環境で存在し常に、血液による物理的な刺激を受けながら存在している。この物理的な刺激は、血管内皮細胞に様々な影響を与えるが、その 1 つが細胞の配向性である。血管内皮細胞は、血液の流れる方向に沿ってすべての細胞が同じ方向を向くという性質を持つことが広く知られている。これは、生体内の血管にかぎらず、生体外でも同様の現象が起こることが知られている[14]。細胞の配向性が高まると、血管内皮細胞の接着が高めるとする報告がある[15]。つまり、細胞の配向性を測定することは間接的に細胞間の接着（VE-cadherin 接着）を測定することとなる。

2.7.3 高速フーリエ変換による画像解析

配向性を定量的に評価する方法は様々ある。特殊な装置を用いてアクチンの接着による表面の引っ張り圧力を調べる方などがあるが、本研究では、フーリエ変換によって画像から解析し定量的に配向性を評価する方法を選択した。フーリエ変換を用いた配向性の解析は、特に繊維の配向性を調べるときに使用される方法であるが、同様にして細胞の配向性も測定することが可能である。フーリエ変換とは、実変数の複素または実数値関数を別の同種の関数に移す変換方法であり、実質的には関数を、振動関数（ \sin, \cos 波）で表すことを意味する。つまり画像の中心からパラメータまでの角度とその強度を測定できる手法である。

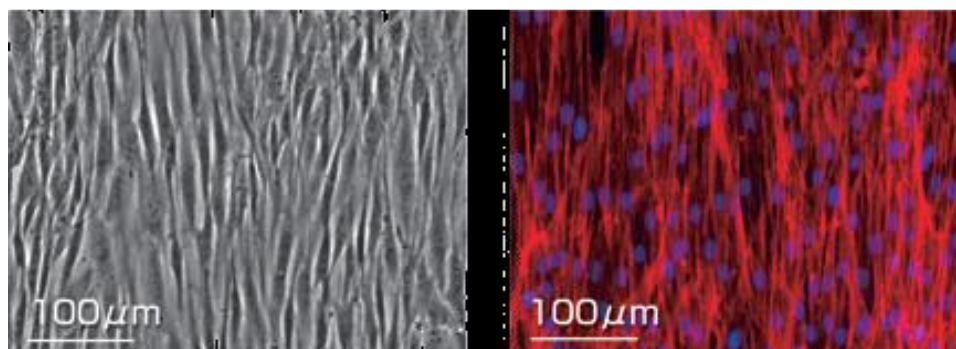


Figure 2.30 細胞の配向性 [14]

2.7.4 試薬および装置

【装置】

- スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ポテンショスタット／ガルバノスタット：HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極：#2080A, HORIBA.
- 位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- Micro Syringe Pump：CT-1, DR-12 V, AS ONE.
- レーザー加工機：Laser PRO C180, GCC Taiwan.
- 画像解析ソフト ImageJ (NIH)
- 画像解析ソフト Photoshop CS4 (Adobe)
- 画像処理ソフト NS2K-Pro (Nanosystem corporation)

【試薬】

- ガラスキャピラリー： $\phi 600 \mu\text{m} \times 3.2 \text{ cm}$, Hirschmann Laborgeräte, Germany.
- オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP)：Sigma Aldrich Japan.
- ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- 血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- Ham-F12 粉末培地：Invitrogen.
- コラーゲン：Cellmatrix Type I-A, Nitta Gelatin.
- Phorbol 12-myristate 13-acetate：PMA, Sigma-Aldrich.
- アクチン染色試薬：Rhodamine Phalloidin, Sigma.
- 核染色液：DAPI, Sigma.
- 非接着性Dish 住友ベークライト セルタイトX

2.7.5 実験方法

【血管様構造の形成】

これまでと同様の手順で、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

【画像解析】

画像の読み込み

取得した画像の画素数を調整し 4 の倍数にする。また画素数が 2 の階乗になるように調節し、縦横のサイズ比が正方形になるように画像を切り取る。

画像の二値化

切り取った画像を移動平均法により二値化処理を行う。二値化処理をする事によって、明るさのムラなどを解消できより正確に配向性を測定することができる。二値化のしきい値は各画像について調節し最適な取得画像になるように調節した。

高速フーリエ変換によるフーリエ変換画像の取得

画像解析ソフト(N2K-Pro)により FFT を行い、取得した画像にフーリエ変換を適応する。

配向角度と配向強度の算出

取得したフーリエ変換画像から配向角度と配向強度を算出する。その際、フーリエ変換画像で、X 軸正方向を 0° として、反時計回りの角度（度）に対する平均振幅を計算する

2.7.6 実験結果と考察

送液開始前と、送液開始後 2 週間後の画像を比較すると明らかに、細胞が送液方向に配向していることが分かる(**Fig. 2.31**)。共焦点顕微鏡による観察でも、GFP 細胞質の蛍光も細胞一つ一つが明らかに細長い細胞質となり、配向していることが分かる。フーリエ変換による画像解析では、4 つのサンプルを準備した。1 つは、通常のディッシュに 1ml の GelMa を加えその上で培養した HUVEC。2 つめは、血管構造で転写する前の金線上の HUVEC。3 つめが、転写下後、送液する前の HUVEC。4 つめが、送液後 2 週間後の HUVEC である。配光角と配向強度の測定結果を(**Fig. 2.31, 32**)に示す。GelMa 上で通常通り静置培養した結果では、ほぼ配向性を示すことはなく、各細胞はバラバラの向きを向いている状態であり、配向強度は 1.089 程度である。一方で、金線上の結果と、転写した後、送液前の HUVEC は若干の配向性、1.27-1.28 程度であった。金線などの細い場所で、HUVEC を培養するとその特性により、若干の配向が見られることは、既に先行研究で得られている結果であり、この結果は、その結果と一致する。配光角は、 1.5° 程度であり、送液方向と一致する。送液後 2 週間後後の HUVEC は明らかに送液方向に配向を示し、配向強度は 1.6 まで上昇した。配光角も 179° と送液方向とほぼ平行になっているのが分かる。この結果から、送液によって細胞は送液方向へと配向性を示すという結果を得られた。この事から、間接的にはあるが、送液によって細胞間接着特に VE-cadherin による接着は強くなり、血管構造が安定化したと推測できる。

2.7.7 本節のまとめ

フーリエ変換を用いた画像解析により送液により、HUVEC は送液方向に対して平行に、配向性を示すことが分かった。

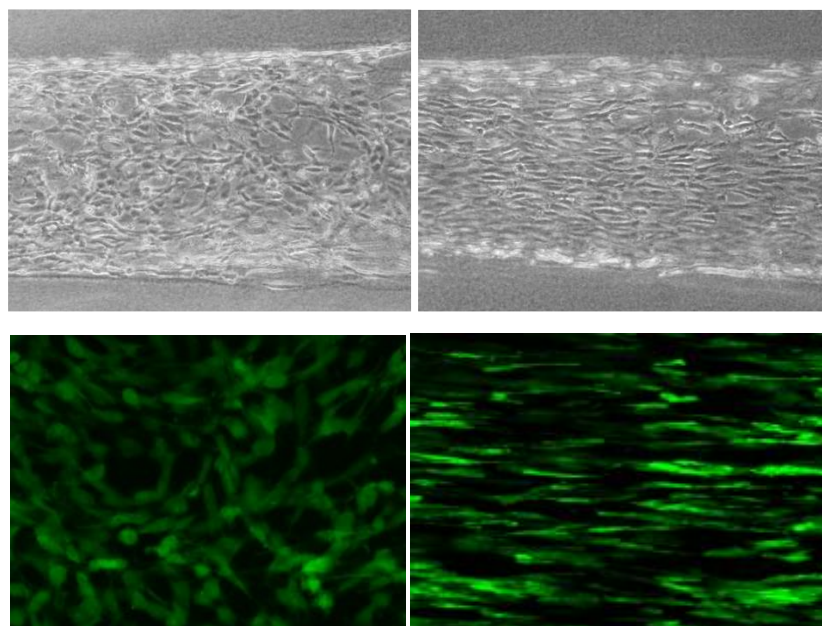


Figure 2.31 (A)(C)送液前の血管構造内の HUVEC の形態
(B)(D)送液から 2 週間後の HUVEC の形態

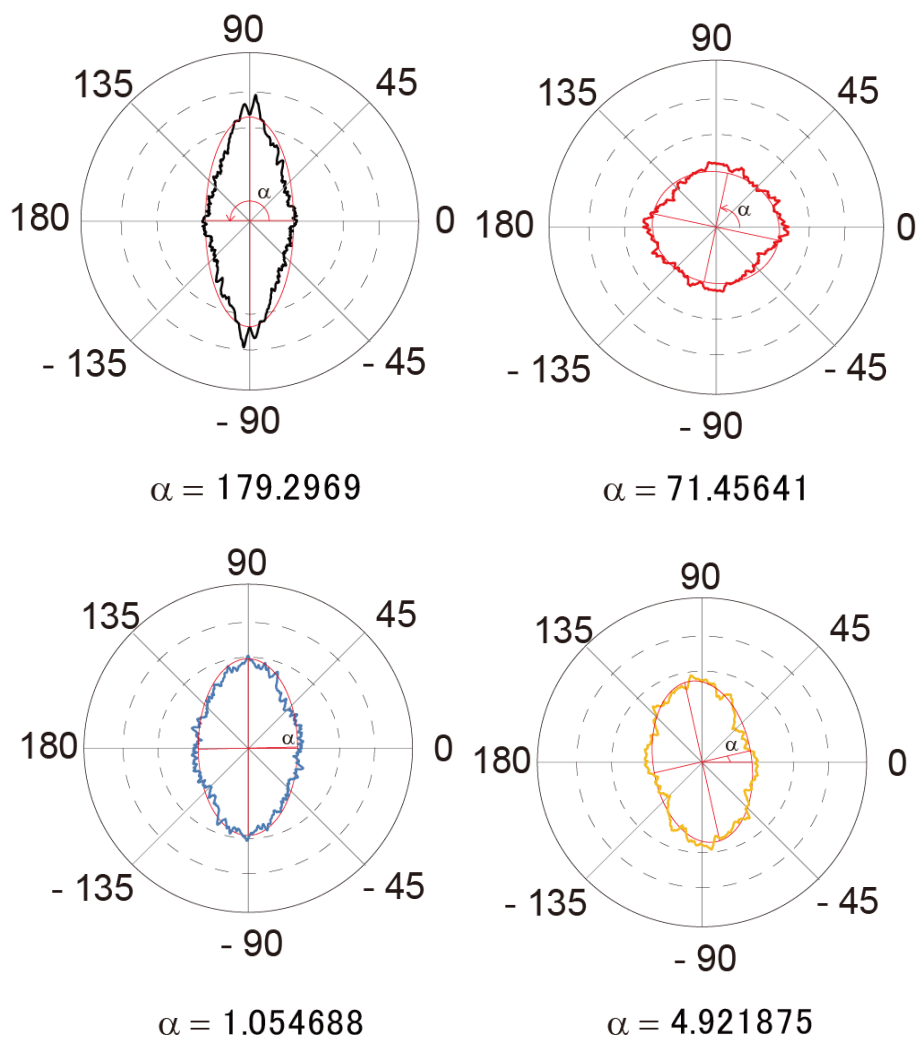


Figure 2.32 画像解析から取得した配向度と配向角

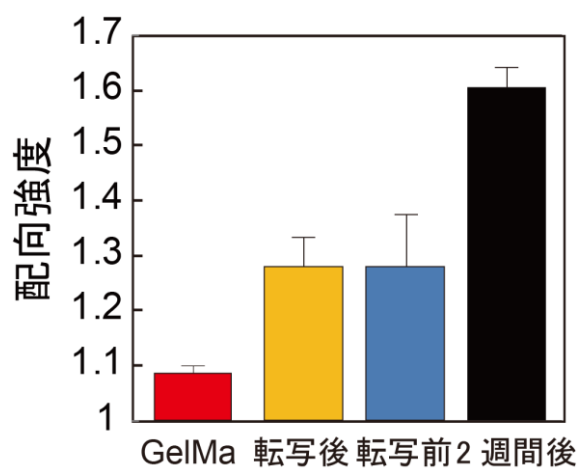


Figure 2.33 配向強度の比較、送液培養前と送液培養後

2.8 電気化学細胞転写によるギャップジャンクションの変化

2.8.1 本節の目的

本節の目的は、ギャップ結合に注目し、電気化学細胞転写の前と後の細胞のギャップジャンクションの状態を観察し、細胞転写によってギャップ結合にどのような変化をもたらすのかを調査することである。転写後にも、ギャップ結合が築かれていれば、電気化学細胞転写によって、ギャップ結合を維持できるということであり、転写後の素早い機能回復が期待できるためである。

2.8.2 細胞間接着

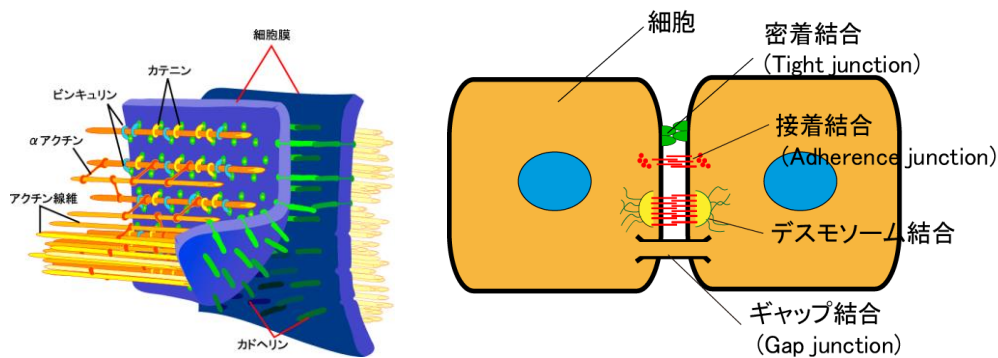


Figure 2.34 細胞間接着の種類[16]

細胞同士はお互いに細胞間で結合をして、様々なシグナルや物質を伝達している。特に血管内皮細胞の細胞間結合は非常に重要で、それぞれの細胞が結合し、コミュニケーションを取ることで、大きな「血管」として機能している。細胞間結合には大きく分けて、密着結合、接着結合、デスモソーム結合、ギャップ結合の4つに分けられる[16]。

密着結合（タイトジャンクション）

密着結合は、その名の通り、細胞どうしをしっかりと密着させるための結合である。膜タンパク質及び膜資質の移動を制限することによって、頂端領域と基底領域とを区別して細胞の極性を維持する

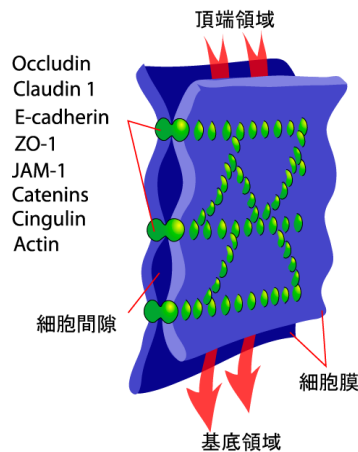


Figure 2.35 密着結合の概念図[16]

と考えられている。膜タンパク質としてクローディンファミリーがこの接着を担っている。タイトジャンクションタンパク質は図のように隣り合った細胞の細胞膜を連続的につなぎ合わせる。そのため、細胞間隙と細胞との自由表面は不連続となる。細胞シートはこのタイトジャンクションによって溶質が自由に組織の内側に侵入することはできない。血管内皮細胞の場合、タイトジャンクションにより、血液成分は漏れだすことなく血管の中を流れ続けている。

接着結合

接着結合（アドヘレンスジャンクション）はタイトジャンクションの下に帯のような接着帯を構成している。血管内皮細胞の場合、VE-カドヘリンという膜タンパク質同士が接着しており、細胞内の端は細胞骨格のアクチンフィラメントと結合している。

デスモソーム結合

デスモソーム結合は、円盤状のタンパク質と、細胞の外側に向かって細胞膜を貫通する結合タンパク質から構成されている。この結合タンパク質もカドヘリンである。ボタン状タンパク質は細胞膜のすぐ内側にあって、ここから突き出す結合タンパク質が、隣の細胞のデスモゾームの結合タンパク質と結合している。ちょうど2枚の布を2個のボタンを介して糸で綴じ合わせたような構造をしている。ボタン状タンパク質には中間径フィラメントのケラチンフィラメントが結合している。上皮細胞の底にも同じ構造があるが、結合タンパク質は隣の細胞のデスモゾームではなく、基底層と直接、結合している。この構造をヘミデスモゾームと呼ぶ[17]。

ギャップ結合

ギャップ結合は、コネキシンと呼ばれる管状の膜貫通タンパク質が隣の細胞のものと結びついた構造をしている。このため、2つの細胞の細胞質は連続することになる。ギャップジャンクションの穴（1.5 nm）は、分子量 1000 以下の分子を通すことができる。穴はサイトゾールのカルシウムイオンの濃度によって開閉する（低いと開き、高いと閉じる）。ギャップジャンクションによって、細胞どうし

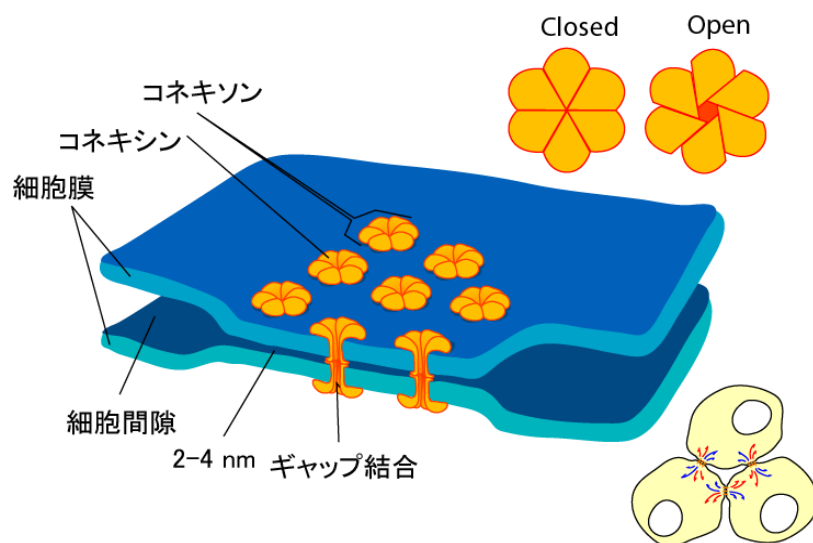


Figure 2.36 ギャップ結合の概念図[16]

が電氣的につながっており、カルシウムイオンのような小さい分子を通過させることにより細胞間の同調が行われている。コネキシンは、タンパク質が 6 つ連なったコネキソンというタンパク質複合体を形成する。その際、**Fig. 2.36** のように 6 つのタンパク質がお互いにずれ合う事で、細胞間の開閉を調節する。

2.8.3 光褪色後蛍光回復法 FRAP

本研究では、ギャップ結合を定量的に評価するために、光褪色後蛍光回復法(FRAP)を用いる。FRAP とは分子の動態を目で見る手法であり、細胞の一部分にレーザーを集光し、その部分を褪色させた後その部分の回復を観察するという手法である。前述のように、ギャップ結合は細胞間で物質をやり取りすることができる。そこで、すべての細胞に蛍光物質を導入し、ただ 1 つの細胞だけ褪色させる。もし細胞間でギャップジャンクションが築かれていれば、周りの細胞からギャップジャンクションを通して蛍光物質が輸送され、蛍光が回復するはずである。ギャップジャンクションによる輸送は、細胞内での輸送に比べて、比較的遅いので、この方法を選択した。

2.8.4 試薬および装置

【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・ポテンショスタット／ガルバノスタット：HA-151, Hokuto denko.
- ・Ag/AgCl 参照電極：#2080A, HORIBA.
- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡オリンパス FMV-1000

【試薬】

- ・ガラス基板：パイレックスガラス研磨品, ϕ 76.2 (3 inch) \times 0.5 mm, Corning Japan. ・オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP)：Sigma Aldrich Japan.
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・共焦点顕微鏡 (Olympus FMV-1000)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・Fluorescein Diacetate(FDA): Molecular Probes
- ・ギャップ結合阻害剤 18 β -GA (18 β -glycyrrhetinic acid) Sigma Aldrich

2.8.5 実験方法

基板洗浄

24×24mm ガラス基板を純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水＝1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

50 μ M RGD ペプチド溶液に基板を一晚（12~15h）浸漬させた後、純水で洗浄した。

基板の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

金基板をディッシュに入れ、EBM-2 に 7.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁した HUVEC を 1 ディッシュ当たり 2 mL 量、つまり 1.5×10^5 cells/dish の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で 37°C、5% CO₂-Air のもとで 12~15 時間培養した。

FDA の導入

細胞に Fluorescein diacetate (FDA)を導入し、20–30 分インキュベートする。その後 PBS で 3 回洗浄した。

GelMa 層の形成

基板上の培地を除去し、PBS に溶かした GelMa の溶液を 500 μ L 程度を静かに滴下し、ディッシュに入れた状態で UV 光を照射してゲル化させた。

電位の印加

金基板を作用極、銀／塩化銀線を参照極としてコラーゲングル内に差込むことで二電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 V を 5 分間印加した。

GelMa 回収

電位印加によって細胞を GelMa 側に転写させた後に、GelMa を基板から剥離させ細胞が表面についた GelMa を回収した。

共焦点顕微鏡による FRAP

共焦点顕微鏡で観察し、特定の細胞にだけにアルゴンレーザーを集光し FDA を褪色させる。その後 10 分間に渡り、タイムラプス撮影を行って蛍光強度を観察する。

2.8.6 実験結果と考察

Fig. 2.37 に FRAP による蛍光変化の画像を示す。赤色の部分に集中的にそれぞれ、ガラス上、GelMa 上、GelMa 転写後、ギャップジャンクション阻害剤添加、1 細胞のサンプルを測定した。レーザー照射前は、どのサンプルも FDA が導入されているため、緑色の蛍光を示している。ここで、短時間に高出力のレーザー照射を行うと、どの細胞も一瞬で蛍光褪色が起こる。図の赤色の部分が、レーザーを照射したエリアである。その後、蛍光は徐々に回復する。500 秒後、ガラス上、GelMa 上、転写後の 3 つのサンプルは、蛍光物質がギャップジャンクションを通して輸送されるために、蛍光が回復し、レーザー照射前と同程度の値まで回復した。一方で、ギャップジャンクションを阻害する物質を加えた場合には蛍光が回復しなかった。このことから、この実験での蛍光回復はギャップジャンクションを通じた輸送によるものであると分かった。同様に、単一細胞でギャップジャンクションを築いていない状態でも蛍光が回復することが分かった。**Fig. 2.38** にレーザー照射後の時間変化に伴う蛍光強度のグラフを示した。転写後の蛍光回復速度も他のサンプルと同程度であるため、ギャップジャンクションの強さも変化していないと結論付けることができる。つまり、電気化学による細胞転写をする前と後では、ギャップジャンクションに変化はなく、ギャップジャンクションに影響をあたえることなく細胞をハイドロゲルへ転写できることが分かった。このことは、実際に血管構造を構築する際に非常に重要になってくる。血管構造を構築した後すぐに、ギャップジャンクションが築かれていれば、各細胞同士の連携がスムーズに行き素早く送液培養を開始できるためである。

2.8.7 本節のまとめ

本節では、FRAP により、電気化学細胞転写の前と後のギャップジャンクションの変化を測定した。その結果、電気化学細胞転写法は、ギャップジャンクションを維持したまま細胞を転写できると分かった。

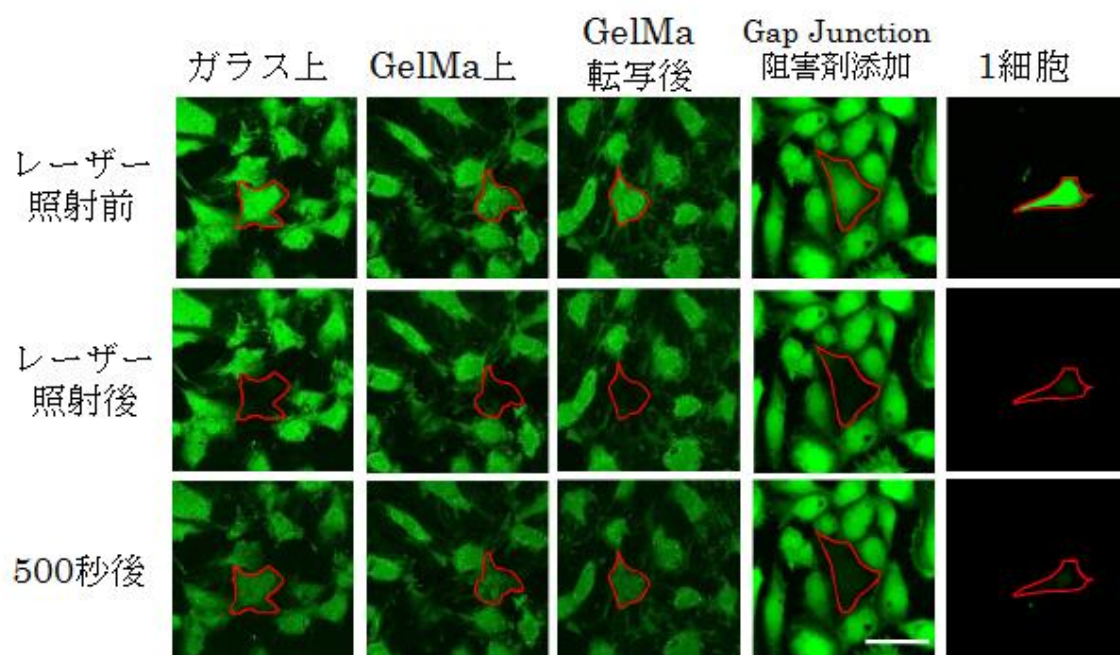


Figure 2.37 時間経過による蛍光強度の回復速度

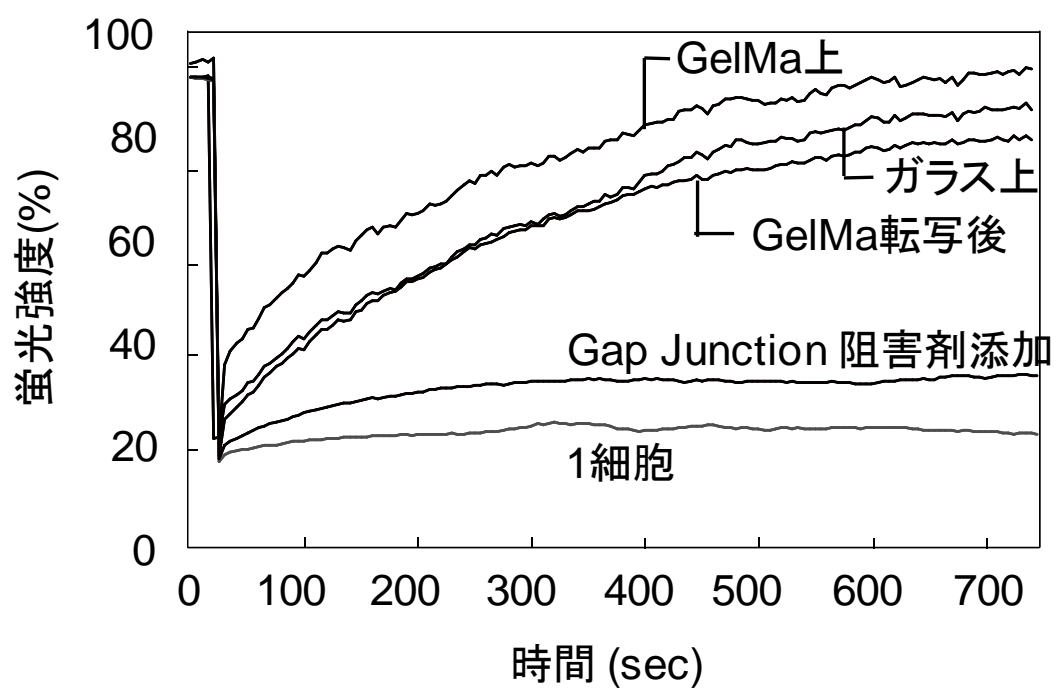


Figure 2.38 時間経過による蛍光強度の回復速度

2.9 電気化学細胞転写によるタイトジャンクションの変化

2.9.1 本節の目的

前節では、細胞間結合の中でもギャップ結合の変化を、電気化学細胞脱離前後で測定した。本節では、密着結合についての変化を解析した。

2.9.1 タイトジャンクション測定方法

本研究では、2 種類の方法を用いて血管構造内の密着結合（タイトジャンクション）を評価した。1 つは、蛍光染色を用いる方法である。前節で述べたように、密着結合はクローディンファミリーのタンパク質によって細胞間結合を行っている。クローディンが接着する細胞小器官はアクチンフィラメントであるが、クローディンタンパク質とアクチンフィラメントの間に ZO-1 と呼ばれるタンパク質が存在し、橋渡しをしている。本研究では、この ZO-1 を免疫染色することによって、タイトジャンクションを評価する。もう一つの方法は、血管構造内に実際に分子量が 70kDa 前後のタンパク質であるデキストランを送液しその漏れ出しを評価する方法である。デキストランには予め蛍光物質を修飾したものをを用いることで、蛍光画像から、デキストランの染み出しを評価することができる。通常生体の血管構造では、60kDa 前後の高分子物質は血管壁を全く通過できない。この血管壁の透過性のことを血管透過性と呼び、様々な疾患の際には、血管が老朽化し、この血管透過性が上昇することが知られている。本節ではこの二種類の方法を用いて、密着結合と血管透過性を評価する。

2.9.4 試薬および装置

【装置】

- ・ スパッタデポジション装置 : CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・ ポテンショスタット／ガルバノスタット : HA-151, Hokuto denko.
- ・ Ag/AgCl 参照電極 : #2080A, HORIBA.
- ・ 位相差蛍光顕微鏡 : IX-71, Olympus.
- ・ Micro Syringe Pomp : CT-1, DR-12 V, AS ONE.
- ・ レーザー加工機 : Laser PRO C180, GCC Taiwan.
- ・ 画像解析ソフト ImageJ (NIH)
- ・ 画像解析ソフト Photoshop CS4 (Adobe)
- ・ 共焦点顕微鏡 Zeiss LSM700

【試薬】

- ・ ガラスキャピラリー : ϕ 600 μ m \times 3.2 cm, Hirschmann Laborgeräte, Germany.
- ・ オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP) : Sigma Aldrich Japan.
- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 : Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken

cell bank.

- 血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- Ham-F12 粉末培地：Invitrogen.
- コラーゲン：Cellmatrix Type I-A, Nitta Gelatin.
- アクチン染色試薬：Rhodamine Phalloidin, Sigma.
- 核染色液：DAPI, Sigma.
- 非接着性Dish 住友ベークライト セルタイトX
- Rabbit anti-human ZO-1 antibody(Life Technologies) 617300
- Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(Invitrogen) A-11008
- Texas-red conjugated Dextran 70,000Da (Invitrogen)

2.9.5 実験方法 1 —蛍光染色を用いた方法—

[血管構造の形成]

これまでと同様の手順で、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。
その後、送液培養を 24 時間行った。

[免疫染色]

以下の方法で微小流路内壁に接着した HUVEC

染色方法

- 1)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 2)固定化：4%パラホルムアルデヒド (in PBS) にてサンプルを固定化した。(室温、10-15 分)
- 3)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 4)透徹：0.1% Triton X-100 (in PBS) にてサンプルを透徹した。(5 分)
- 5)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 6)Blocking サンプルを 1%BSA/PBS に 1 時間浸漬しブロッキングを行った。
- 7)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 8)一次抗体の反応 Rabbit anti-human ZO-1 antibody を PBS で 1:200 希釈し、浸漬を室温で 2 時間行った。
- 9) 洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 10) 二次抗体の反応 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG(Invitrogen) A-11008
- 11)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 12)観察：蛍光顕微鏡及び共焦点顕微鏡により観察した。

2.9.6 実験方法 2—デキストランを用いた血管透過性の評価—

[血管構造の形成]

これまでと同様の手順で、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

その後、1%Texas-red conjugated Dextran を微小血管構造内に送液しながら、5min 間隔で顕微鏡撮影した。

[画像処理による蛍光強度の定量化]

取得した画像から、蛍光強度を ImageJ を用いて値を抜き出し、時間経過による血管構造からのデキストランの染み出しを定量的に解析した。

2.9.7 実験結果と考察

実験方法 1 の ZO-1 の染色結果を、**Fig. 2.39** に示す。転写前の金基板上で血管内皮細胞がタイトジャンクションを形成していることを確認した(**Fig. 2.39-A**)。ZO-1 は細胞の周りを囲むように局在化する。転写後すぐのサンプルでも、ZO-1 は膜の周りに局在化していたため、転写前後ではタイトジャンクションは変化しないのではないかと考えられる。その後 24 時間培養しても、タイトジャンクションは維持されていた。更に、血管構造を作製してから 7 日後に免疫染色をした結果が **Fig. 2.40** である。ZO-1 はマイクロチャンネル内でも細胞の周りに局在化してタイトジャンクション形成していた。更に、前節で検証した送液培養による配向性の変化も観察することができた。送液培養によって、液流れ方向と平行にタイトジャンクションの形も配向していた。

実験方法 2 のデキストラン送液による血管透過性解析の結果を **Fig. 2.41** に示す。内表面に HUVEC が接着していないハイドロゲルによるマイクロ流路構造では、デキストラン溶液を導入するとすぐに拡散を開始し、導入から 50 分後には 1 min 程度まで拡散していた。この拡散は単純にゲルの拡散係数に従って進行する。一方で、内表面を HUVEC で多い血管様構造とした流路では、表面を覆った後すぐにデキストラン溶液を導入しても、拡散が抑えられていた。一方で 120 分という時間が経つ徐々に拡散していつている様子がわかる(**Fig. 2.42**)。この結果は、単に HUVEC が表面を覆ったことにより、HUVEC 自身や彼らが産生したタンパク質が拡散を妨げているのではないかと考えている。そして血管構造作製から 24 時間後は 120 分経過後も全く拡散せずに血管内にとどまっている様子が観察された。このことから脱理から 24 時間後には、血管内皮細胞同士のタイトジャンクションが機能し、血管透過性を抑制したのではないかと考えている。

2.9.8 本節のまとめ

本節では、電気化学的な細胞転写による密着結合の変化を評価し、転写前後で密着結合は保たれていることを示した。また、蛍光デキストランを血管構造内に送液する実験では、血管内皮細胞が流路内表面を覆っているため、血管の透過性が抑えられた。また、細胞転写 24 時間後には完全なバリア能力を示すことを確認した。

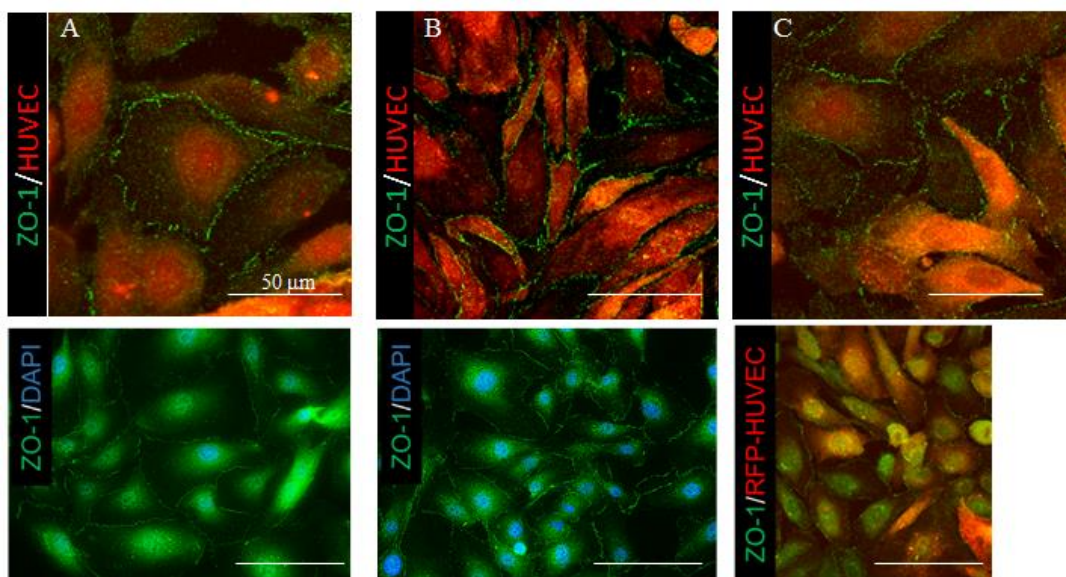
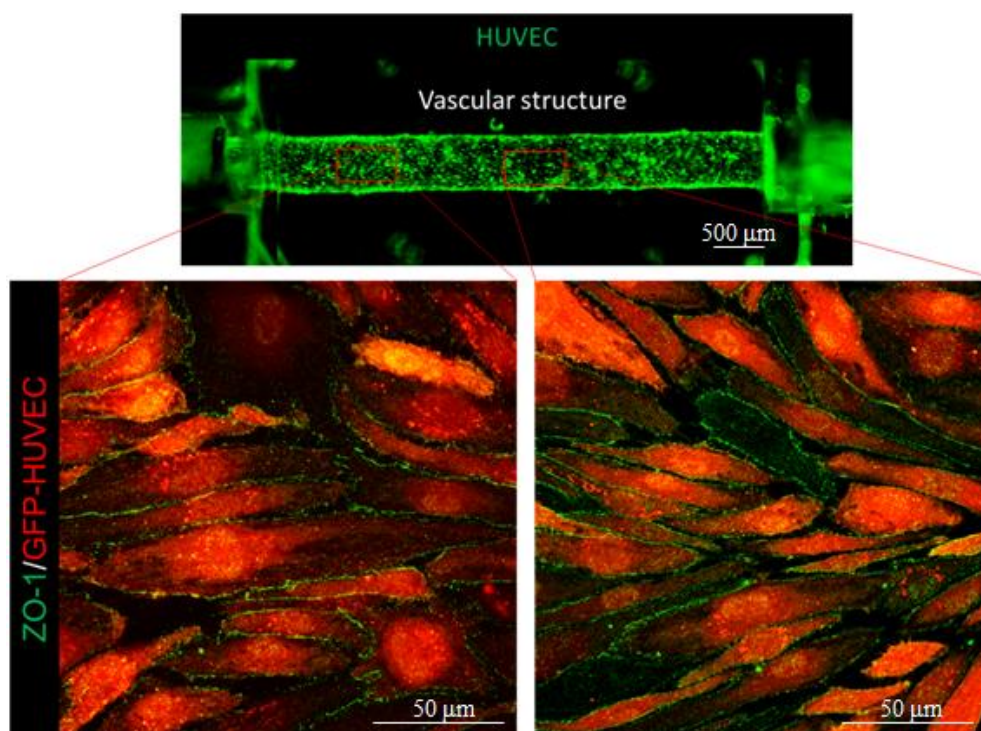


Figure 2.39 ZO-1 の染色結果(A)細胞転写前(B)細胞転写後 0 時間(C)細胞転写後 24 時間後



送液培養一週間後のタイトジャンクション

Figure 2.40 ZO-1 の染色結果(A)細胞転写前(B)細胞転写後 0 時間(C)細胞転写後 24 時間後

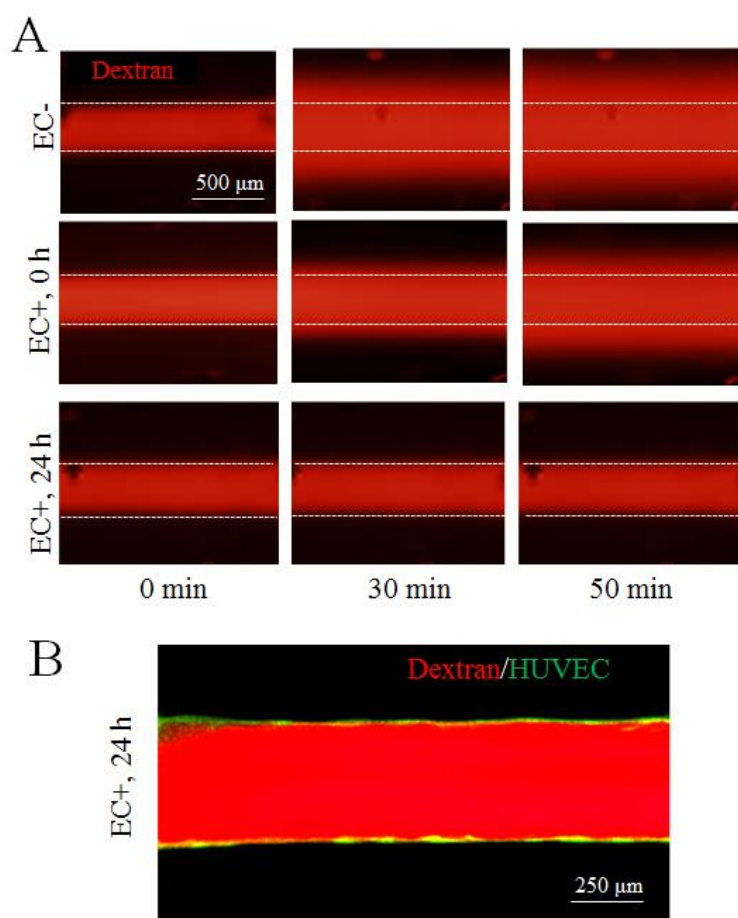


Figure 2.41 デキストラン送液の血管透過性試験(A)0, 30, 50 分間のデキストランの染み出し。(B)24 時間後のデキストランと血管内皮細胞の共焦点顕微鏡写真

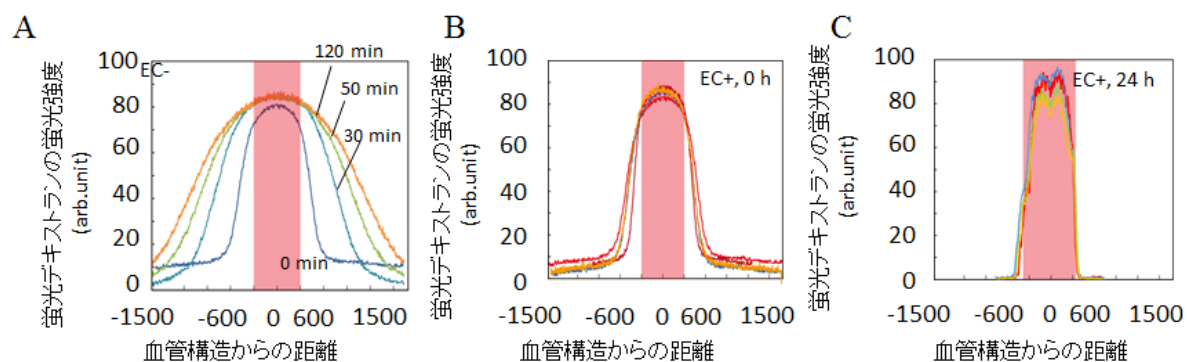


Figure 2.42 時間経過による蛍光強度の回復速度(A)血管内皮細胞なし(B)血管内皮細胞あり 0 時間(C)血管内皮細胞あり、24 時間後

2.10 電気化学細胞転写法による細胞極性の変化

2.9.1 本節の目的

本節では、電気化学細胞転写により、この細胞極性がどう変化するかを観察し評価する。細胞を GelMa などのハイドロゲルに転写すると、これまで基底側だった細胞膜は瞬時に頂端側へと入れ替わり、逆に頂端側だった細胞膜は、基底側へと入れ替わることとなる。この時、実施に細胞は極性を取り戻し、細胞の極性もひっくり返るのかを検討することで、電気化学細胞転写によって作製した血管構造の血管内皮細胞は、しっかりと細胞極性を持っていることを示す。

2.9.2 細胞極性

密着結合によって、隔てられた細胞は、頂端領域と基底領域という別々の領域となりそれぞれの側で発言している膜タンパク質も異なっている。これを細胞の極性と呼び、細胞は常に極性を維持し意識しながら細胞の活動を続けている。血管内皮細胞では特に、頂端側は常に血液をふれあい、基底側は、基底膜や ECM、その他の細胞と接着していて、それぞれの領域で異なった働きをする。例えば、頂端側から養分を通して基底側得て輸送する。逆に細胞が出した、老廃物は基底側から、頂端側へと輸送されその老廃物は、血液に乗せて肝臓へと運ばれる。この他にも、血管内皮細胞が、それぞれの領域を認識することで、白血球のトラップや、抗凝固因子の発現などを、適切に行なっている。

2.9.3 ICAM-1

電気化学細胞転写前後での細胞極性を評価するために膜タンパク質の 1 つである ICAM-1 を利用する。ICAM-1 は、頂端側に特異的に発現する膜タンパク質であり、CD54 やセレクチンとも呼ばれる。ICAM-1 は生体内では、**Fig. 2.34** に示すように炎症部位における白血球の血管外遊走に関与している。組織の炎症時に TNF- α や IF-1 等によって活性化された血管内皮細胞は、細胞の頂端側にこの ICAM-1 を発現する。血液中を流れる好中球はこの ICAM-1 を発見し特異的に結合することにより血管内皮細胞間への遊走を果たす。つまり ICAM-1 は頂端側に特異的に発現する細胞マーカーであるといえる。

2.9.4 試薬及び装置

【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・ポテンシオスタット／ガルバノスタット：HA-151, Hokuto denko.
- ・Ag/AgCl 参照電極：#2080A, HORIBA.
- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9

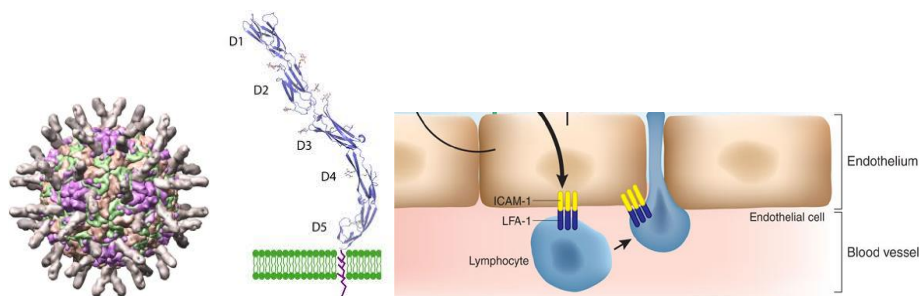


Figure 2.43 ICAM-1 の構造とその役割

【試薬】

- ・ ガラス基板：パイレックスガラス研磨品， ϕ 76.2 (3 inch) \times 0.5 mm, Corning Japan. ・ オリゴペプチド (CGGGKEKEKEKGRGDSP)：Sigma Aldrich Japan.
- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・ 共焦点顕微鏡 (Olympus FMV-1000)
- ・ ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・ ICAM-1 antibody Sigma Aldrich
- ・ TNF- α Sigma Aldrich

2.9.5 実験方法

基板洗浄

ガラス基板を純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水＝1：1：4の沸騰水溶液に5分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

Au/Cr 層のスパッタ

スパッタリング装置を用い、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 2 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

500 μ M RGD ペプチド溶液に基板を一晩（12～15h）浸漬させた後、純水で洗浄した。

基板の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金基板をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

金基板をディッシュに数枚入れ、EBM-2 に 2.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁した HUVEC を 1 ディッシュ当たり 6 mL 量、つまり 1.5×10^5 cells/dish の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で 37°C 、5% CO_2 -Air のもとで 12~15 時間培養した。

TNF- α 導入による血管内皮細胞の活性化

細胞に TNF- α を導入し、4 時間インキュベートする。その後 PBS で 3 回洗浄した。

GelMa 層の形成

基板上の培地を除去し、PBS に溶かした GelMa の溶液を 500 μL 程度を静かに滴下し、ディッシュに入れた状態で UV 光を照射してゲル化させた。

電位の印加

金基板を作用極、銀／塩化銀線を参照極としてコラーゲンゲル内に差込むことで二電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 V を 5 分間印加した。

GelMa 回収

電位印加によって細胞を GelMa 側に転写させた後に、GelMa を基板から剥離させ細胞が表面についた GelMa を回収した。

[血管様構造の核・アクチン染色]

ストック溶液

試薬 Rhodamine Phalloidin を MeOH に溶解し、濃度を 14 μM に調整した。

染色溶液

1% BSA を含む PBS 溶液にストック溶液を加え、濃度を 100 nM とした。

染色方法

- 1) 洗浄 : PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 2) 固定化 : 4%パラホルムアルデヒド (in PBS) にてサンプルを固定化した。(室温、10 分)
- 3) 洗浄 : PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 4) 透徹 : 0.1% Triton X-100 (in PBS) にてサンプルを透徹した。(3~5 分)

- 5)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 6)アクチン染色：Rhodamine Phalloidin 染色溶液にてサンプルを染色した。(室温、20 分)
※このとき、サンプルを暗室に置くか、アルミホイルで覆った。
- 7)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 8)核染色：DAPI 染色液にてサンプルを染色した。(室温、5 分)
- 9)洗浄：PBS 溶液にてサンプルを 3 回洗浄した。
- 10)観察：蛍光顕微鏡により観察した。

ICAM-1 の免疫染色

CD54 antibody にてサンプルを染色しその後 30 分間のインキュベートを行った。

共焦点顕微鏡による ICAM-1 の観察

共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LSM-700) により蛍光染色したサンプルを、3 次元的に解析し、その断面図から細胞の極性を評価する。ICAM-1 が発現している方が、細胞の頂端側である。

2.9.6 実験結果と考察

転写前は、頂端側には ICAM-1(緑)が発現していて、基底膜には ICAM-1 は発現していない。電気化学転写により、細胞が接着して方が入れ替わる。転写 0 時間ではこれまで頂端側で ICAM-1 は発現していた方は、ICAM-1 の発現が残っている。一方でこれまで基底側であった方にも若干の発現が見られる転写後 12 時間後には、これまで、ICAM-1 の発現があった方は発現がなくなり、ICAM-1 の発現がなかった方には新しく発現している様子が観測できた。このことから、電気化学細胞転写後すぐには、細胞極性はそのまま反転したままであるが、時間が経つに擦れて、細胞極性の再構築が起こり、少なくとも細胞転写 12 時間後には、細胞極性はしっかりと反転し、それぞれ頂端側と基底側で異なった機能を発現していることが分かった。

2.9.7 本節のまとめ

本節では、ICAM-1 という頂端側にしか発現しない、膜タンパク質を染色することによって細胞の極性を細胞転写の前後で比較することで、細胞転写により極性がどう変化するのかを検討した。その結果、少なくとも転写 12 時間後には細胞の極性が完全に反転し、細胞自身が頂端側と基底側の区別をしているということが確認できた(Fig. 2.44, 45)。これにより、血管構造を作製した際も細胞は極性を持ち、血液側を認識することが分かったので、血管としての機能を行うことができると結論づけた。

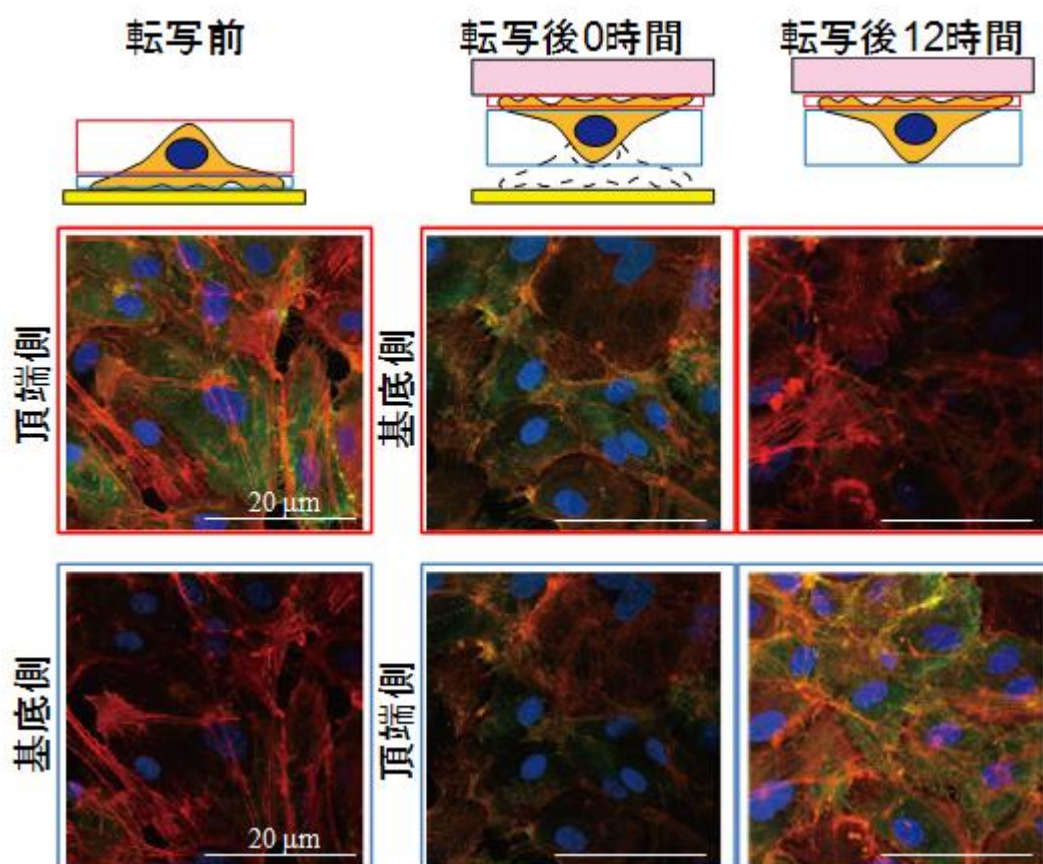


Figure 2.44 ICAM-1 の免疫染色による、細胞極性の測定(A)転写前の頂端側の染色画像(B)転写前の基底側(C)(D)転写後 0 時間の基底側と頂端側(E)(F)転写後 12 時間の基底側と頂端側

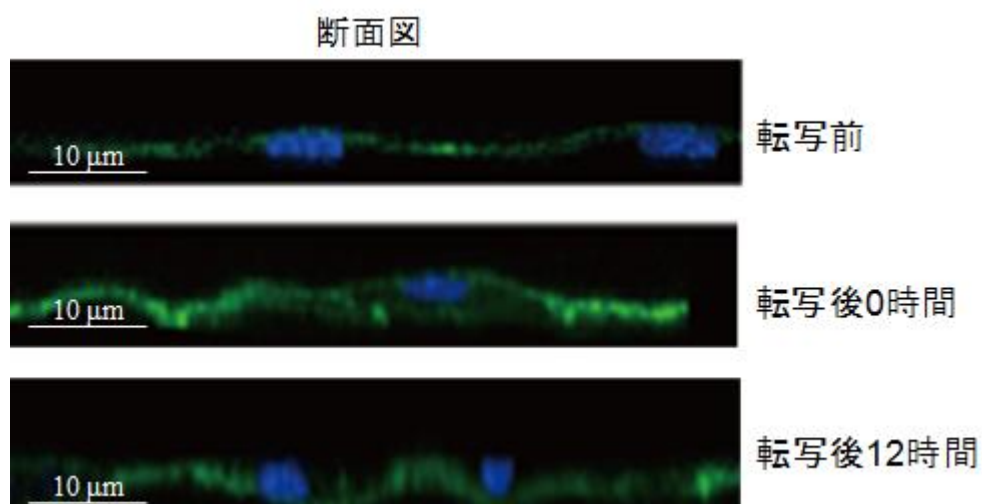


Figure 2.45 断面図
(A)転写前(B)転写後 0 時間(C)転写後 12 時間

2.11 本章のまとめ

本章では電気化学を用いた血管構造の作製方法を述べた。その際作製に用いるオリゴペプチドの設計利点を説明し光架橋性のゼラチンゲルの作製方法とその特性を述べた。そして最後に、これらの要素を組み合わせ、電気化学的に細胞脱離させ、血管構造を作製する方法を示した。更に、作製した血管構造の評価を細胞の配向性、ギャップジャンクション、タイトジャンクション、細胞極性の4つの観点から検証し、それぞれの機能を持つことを示した。以上の結果から、三次元的な組織を作成するのに必要不可欠な、血管構造を短時間で作製する手法を確立した。また、その血管構造は生体と同等の機能を持っており、移植組織としては十分な機能を持っている血管構造と結論づけた。

2.12 参考文献

- [1] Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*. 2003;24:2309-16.
- [2] Okano T, Matsuda T. Muscular tissue engineering: capillary-incorporated hybrid muscular tissues in vivo tissue culture. *Cell Transplantation*. 1998;7:435-42.
- [3] Sasagawa T, Shimizu T, Sekiya S, Haraguchi Y, Yamato M, Sawa Y, et al. Design of prevascularized three-dimensional cell-dense tissues using a cell sheet stacking manipulation technology. *Biomaterials*. 31:1646-54.
- [4] Haraguchi Y, Shimizu T, Sasagawa T, Sekine H, Sakaguchi K, Kikuchi T, et al. Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nat Protocols*. 7:850-8.
- [5] Chassepot A, Gao L, Nguyen I, Dochter A, Fioretti F, Menu P, et al. Chemically Detachable Polyelectrolyte Multilayer Platform for Cell Sheet Engineering. *Chemistry of Materials*. 24:930-7.
- [6] Inaba R, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues. *Biomaterials*. 2009;30:3573-9.
- [7] Seto Y, Inaba R, Okuyama T, Sassa F, Suzuki H, Fukuda J. Engineering of capillary-like structures in tissue constructs by electrochemical detachment of cells. *Biomaterials*. 2010;31:2209-15.
- [8] Mochizuki N, Kakegawa T, Osaki T, Sadr N, Kachouie NN, Suzuki H, et al. Tissue engineering based on electrochemical desorption of an RGD-containing oligopeptide. *J Tissue Eng Regen Med*.
- [9] Kakegawa T, Mochizuki N, Sadr N, Suzuki H, Fukuda J. Cell-Adhesive and Cell-Repulsive Zwitterionic Oligopeptides for Micropatterning and Rapid Electrochemical Detachment of Cells. *Tissue Eng Part A*.
- [10] Cavalcanti-Adam EA, Volberg T, Micoulet A, Kessler H, Geiger B, Spatz JP. Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands. *Biophysical Journal*. 2007;92:2964-74.
- [11] 新田ゼラチン. コラーゲンの構造とゼラチン. <http://www.nitta-gelatin.co.jp/>.
- [12] Michalopoulos G, Russell F, Biles C. Primary cultures of hepatocytes on human fibroblasts. *In Vitro*. 15:796-806.
- [13] Wicha MS, Lowrie G, Kohn E, Bagavandoss P, Mahn T. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1982;79:3213-7.
- [14] 細胞シートティッシュエンジニアリングセンター. 微細加工技術が実現する次世代型温度応答性培養基材の開発. <http://www.twmu.ac.jp/ABMES/CSTEC/ja/cssurf>.
- [15] Inoguchi H, Tanaka T, Maehara Y, Matsuda T. The effect of gradually graded shear stress on the morphological integrity of a huvec-seeded compliant small-diameter vascular graft. *Biomaterials*. 2007;28:486-95.

[16] 細胞接着分子.

<http://www.sc.fukuoka-u.ac.jp/~bc1/Biochem/adhmol.htm>.

[17] 細胞膜. 細胞間結合. cell membrane. <http://www.tmd.ac.jp/artsci/biol/textbook/cellmemb.htm>.

第三章

細胞の自己組織能を利用した微小血管構造の誘導

3.1 はじめに

前章では、電気化学的細胞転写と光架橋性のゼラチンゲルを組み合わせることによって、短時間で血管構造を構築する手法を確立した。この血管構造は直径が $500\ \mu\text{m}$ であり、その血管構造の間隔は $500\ \mu\text{m}$ で、3本ないしは9本の血管構造を作製した。一方で、肝臓の血管構造は直径が $10\text{--}50\ \mu\text{m}$ 程度の血管構造も備えている。このことから、 $500\ \mu\text{m}$ の血管構造を $500\ \mu\text{m}$ の間隔で配置しただけでは、高密度に細胞をゲルに充填した際には、不十分である。1章で述べたように、酸素の拡散は、 $100\text{--}150\ \mu\text{m}$ 程度が限界であり、それ以上離れたエリアには理論的に酸素が届くことはない。一方で、本手法は、鋳型の金ニードルの直径や配置を変更することで、血管構造の直径と配置も自由に変えることができるのも特徴である。実際に、予備検討では、直径が $100\ \mu\text{m}$ の血管構造を約 $200\ \mu\text{m}$ の間隔で配置することが可能であることを確認している。単純に考えれば、これらの間隔を狭くすれば解決できる問題のようにも思われる。しかし、間隔を近づけ過ぎると、ゲルの容量が減少し充填できる細胞密度が減ってしまう。また、血管径を小さくすればするほど、血管内壁にかかる圧力が上昇していき、過剰な圧力は、血管内皮細胞の剥離を引き起こす。したがって、肝臓ほどの細胞密度と血流を受け取るためには、血管構造の口径と配置の変更だけでは限界がある。この問題は、血管構造を分岐構造にすることで解決できると考えられる。しかし、本手法では、鋳型を直線的に引きぬく必要が有るため分岐型の血管構造は作製できない。そこで、血管内皮細胞の自己組織的な分岐型血管構造形成能を用いて、等間隔配置された血管構造の間に分岐型の血管構造を作製する手法を発想した。本章では、ハイドロゲル内に微小な血管構造を作製する条件をゲル包埋培養で最適化を行い、その条件を用いて、等間隔配置された血管構造の間を分岐型の血管構造で接続することを行った。

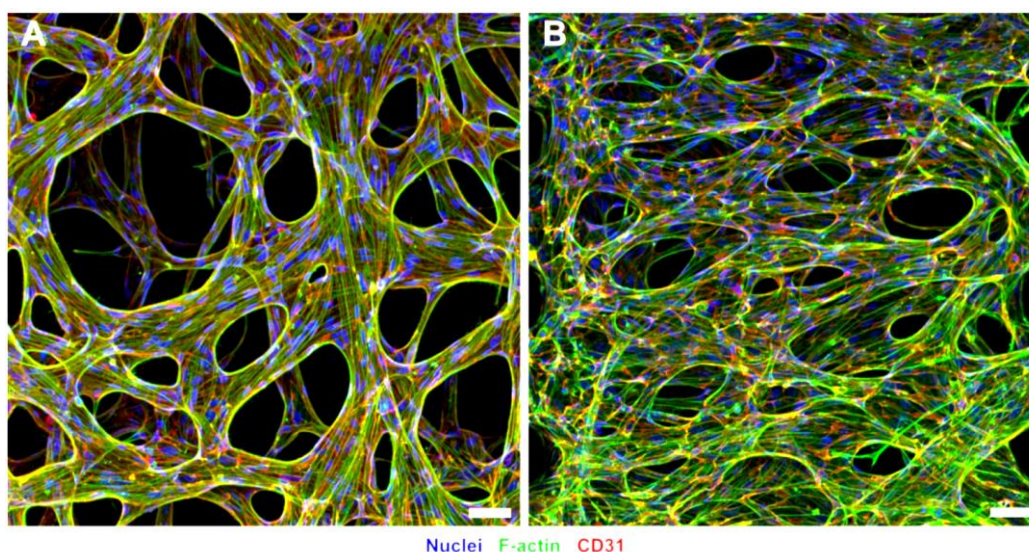


Figure 3.1 コラーゲンゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワーク[1]

3.2 血管内皮細胞の血管ネットワーク形成

3.2.1 血管内皮細胞の自己組織的な血管構造形成

血管内皮細胞である HUVEC はコラーゲンゲル内で培養することで、微小なネットワークを形成する[1]。このネットワーク構造は細胞同士がただ繋がっているだけではなく、80–90% 以上管腔構造となっており、内部も繋がっている。HUVEC がゲル内で血管ネットワークを形成するかどうかは血管内皮細胞の密度、ハイドロゲルの種類、間葉系幹細胞の有無で異なってくる。これまで、コラーゲンゲル内で、血管内皮細胞の密度や、血管内皮細胞と間葉系幹細胞との共培養によってネットワーク形成能が上昇するなどの研究は多く行われてきた。一方で、本研究で用いている GelMa 内ではどのような細胞密度または、ハイドロゲルの濃度で血管構造を誘導できるか明らかにされていない。

3.2.2 Tubulogenesis

血管が形成する過程のなかで、第一章で説明した血管新生（Angiogenesis）、脈管形成（Vasculogenesis）と並んで管腔構造を形成する Tubulogenesis は重要なプロセスである[2]。つまり、血管内皮細胞が集合しネットワーク状に繋がることと、Tubulogenesis によって管腔構造が形成される過程は独立して起こり、別のプロセスで進む。その多くは血液を介した圧力や成長因子によって管腔構造を形成する[3]。血管新生を伴った、Tubulogenesis では主に 3 つの過程から管腔構造を形成する。1 つめは、幾つかの細胞が円柱状の構造を形成し、その後円柱の内部の細胞がアポトーシスをおこし筒構造が形成される過程である。2 つ目は 2 つの細胞が紐状に凝集した後に内部を開くように細胞が形態変化を引き起こす過程。3 つ目は、1 つの細胞が紐状に隣り合う細胞と接着した後に、ピノサイトスによって自身の細胞の内部に穴を開ける過程である。これら異なる過程によって誘導された血管構造はそれぞれ異なった口径の血管構造となる。In vitro の血管形成に置いては 2 つめと 3 つめの

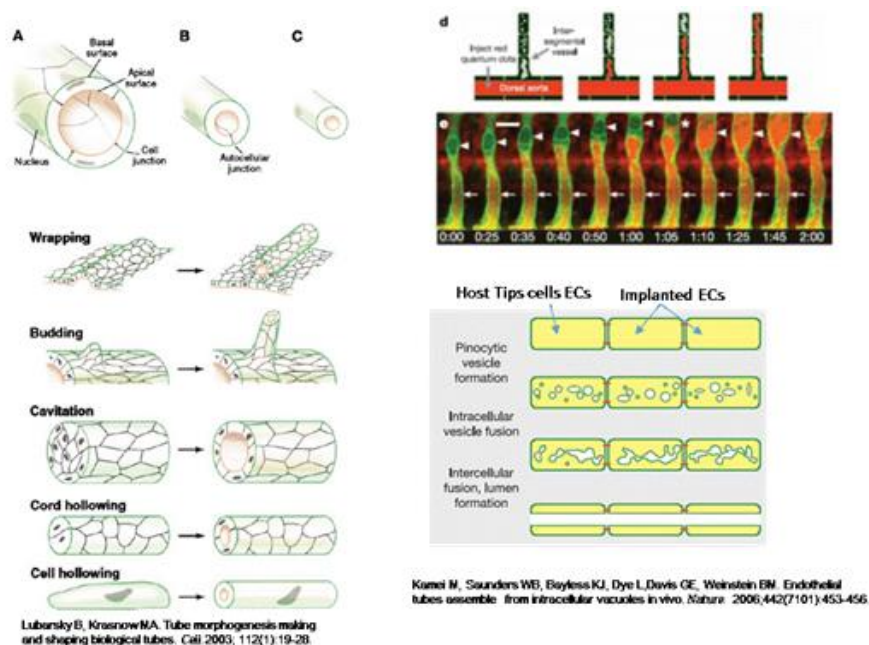


Figure 3.2 Tubulogenesis による管腔構造の形成過程

過程で管腔構造形成が起こる。

3.2.3 本節の目的

本節では、どのような条件で GelMa 内で血管ネットワークが形成できるかを検証し、最適化を行う。この時、HUVEC の継代数による管腔構造形成の変化を観察し、管腔構造かどうかを確認した。

3.2.4 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・RFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)

【実験手順】

血管内皮細胞の包埋

GelMa 溶液を調製し、そこに GFP-HUVEC(P7)もしくは HUVEC(P4) (2.0×10^6 cells/ml) と MSC を 1.0×10^5 cells/ml を包埋して、ガラスボトムディッシュ上で包埋培養する。(液量は 500 μ L で統一)

ハイドロゲル内の血管構造の観察

培養 3 日目でアクチン、細胞核を染色後、蛍光顕微鏡観察もしくは共焦点顕微鏡観察する。

3.2.5 実験結果と考察

この実験では異なる継代数 Passagenumber の HUVEC を用い、血管ネットワークが形成するかどうかを評価した。HUVEC(P7)は細胞包埋から 24 時間程度で HUVEC が伸展し、それぞれの細胞がつながる様子が観察できた。培養 3,4 日後の血管構造を **Fig. 3.3** に示す。共焦点顕微鏡を用いて断面を観察すると、部分的に空洞構造つまり、管腔構造になっていることが観察できた。しかし、管腔構造になっている部分は一部分であり、全体としてネットワーク構造は繋がっていないことも確認できた。本研究では、全体の血管ネットワークが繋がり、送液した培地がこの血管構造内に流れこむことを目

的としているが、このような部分的な血管ネットワークでは、目的は達せられない。更に、直径も 10 μm にも満たないものが多く、このような状態ではおそらく中を液が流れることはない。

そこで、継代数の若い HUVEC (P3, 4) を用いることとした。同様の条件で、GelMa 内に血管ネットワークを形成させた結果が **Fig. 3.4** である。HUVEC(P7)を用いた時と比べると、より血管ネットワークが全体的に広がり、かつ形成が非常に早かった。具体的には 6 時間・8 時間でこのようなネットワークを形成し、24 時間後に完全なネットワークを形成した。また、血管の直径は平均して 30 μm 程度であり 100 μm 近くになるものまであった。共焦点顕微鏡の観察から、全体的にも血管構造は管腔構造になっておりその総距離は少なくとも 10 mm 以上あった。

また、顕微鏡観察によって解析したところ、15-20 μm 程度から管腔構造になっている確率が増えネットワークの構造が 25-30 μm を超えるとほぼ確実に管腔構造になっていた。

この結果の違いは、HUVEC の継代数の違いが関係している。本研究で用いているヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)は、ヒトの臍帯由来の初代血管内皮細胞である。継代数を重ねていくと、増殖能が低下していくが同時に、血管構造の形成能力も減少していくことが知られている[4]。この HUVEC をコラーゲンゲル内に包埋し培養する際には、P7 までの継代数の細胞を使用することが一般的であるが、本研究で用いる GelMa ではこのように P4-5 までの継代数を使用して血管ネットワークを作製する必要がある。また、本実験では、血管内皮細胞と同時に間葉系幹細胞も包埋し培養している。間葉系幹細胞は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を多く放出することが知られ、自身も周皮細胞や平滑筋細胞といった血管系の細胞に分化する。既に、MSC と HUVEC を共培養することによって血管構造の形成能が上昇し、長期間そのネットワークを維持できることが報告されている[5]。以降の実験では、HUVEC の P3 または P4 と間葉系幹細胞の共培養系で血管ネットワークを作製することとした。

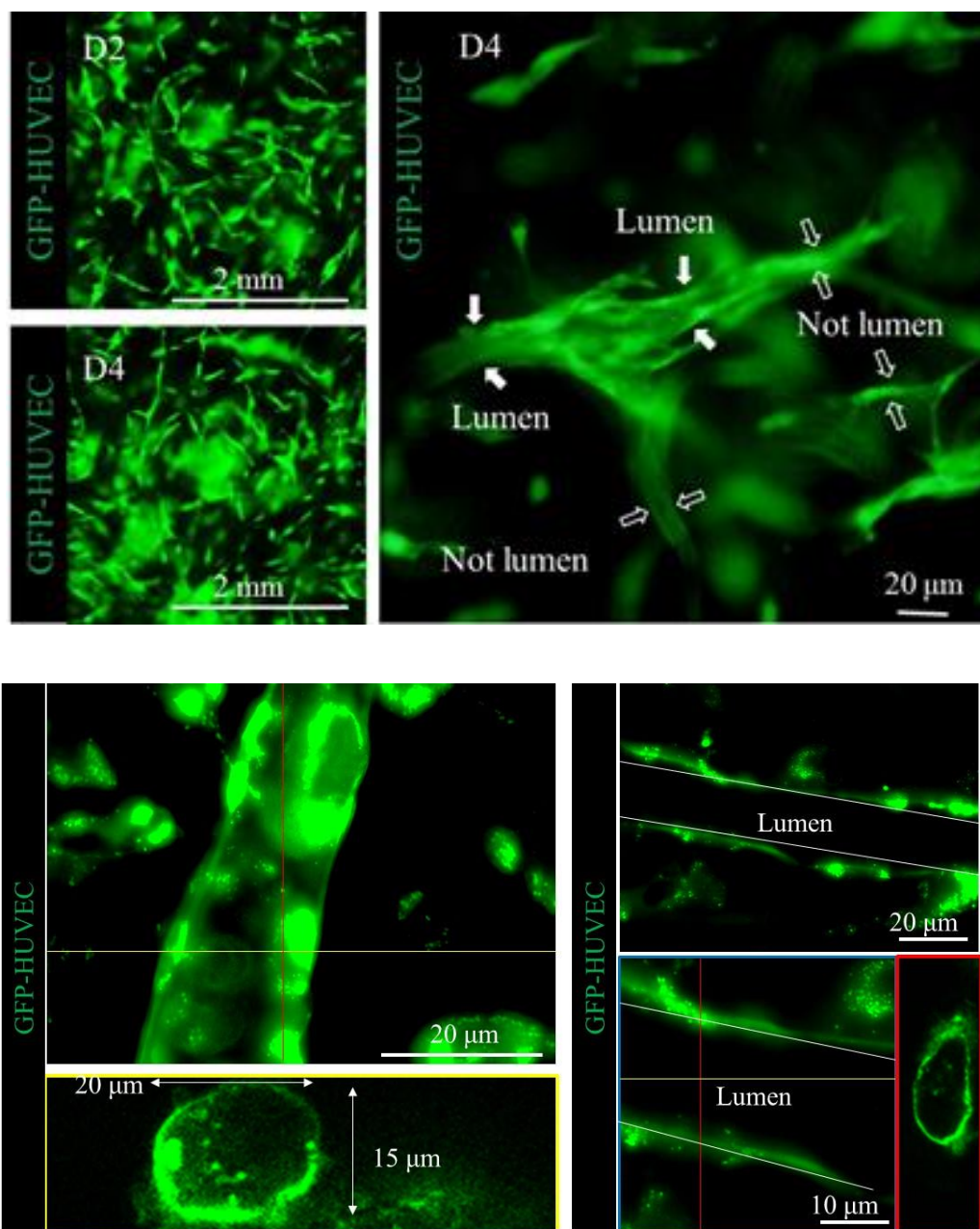


Figure 3.3 ハイドロゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワーク (Passage7)
 一部分は管腔構造を形成するが、そのネットワークは断続的であり、全体として血管ネットワークは未成熟であり未完成

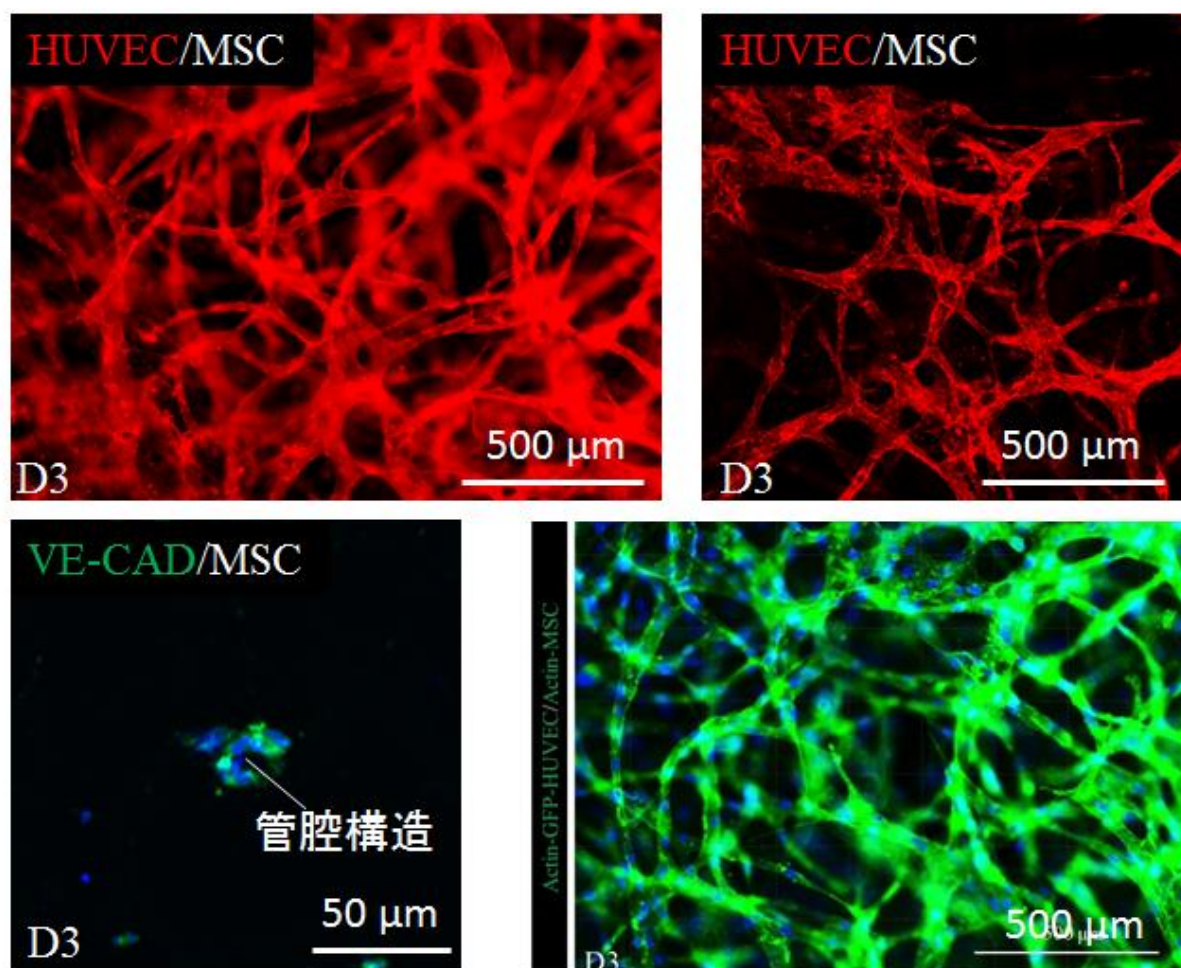


Figure 3.4 ハイドロゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワーク Passage4
連続的な血管ネットワークを形成した。

3.3 微小血管構造の管腔構造と蛍光ビーズ送液

3.3.1 本節の目的

本節では、セルカルチャーインサートを用いて pressure drop を作り出し栓節で作製した血管構造の中に実際に蛍光ビーズが流れるか、つまり、実際に貫通された血管構造を作製できたかを評価する。

3.3.2 血管内皮細胞の自己組織的な血管構造形成

前章では、HUVEC と MSC を共培養し血管ネットワークを形成する最適な条件を見つけた。その結果、細胞密度が血管内皮細胞が 2.0×10^6 cells/ml 間葉系幹細胞が 1.0×10^5 cells/ml という細胞密度によって良好な血管ネットワークを形成することを確認した。また血管内皮細胞の継代数が 4 もしくは 5 の時に周囲の細胞がお互いに連結された血管ネットワークを形成することも確認した。共焦点顕微鏡による観察では、これらのネットワーク構造が管腔構造になっていることを確認した。しかし、ハイドロゲル内に形成された血管ネットワークは入り口と出口のない血管構造であることが過去の研究から分かっていた[1]。つまり、ハイドロゲル内部にできた血管構造の管腔構造には強制的に培養液を送りこむどころか、液的につながっていない。これは、ハイドロゲルの上面、もしくは下面に血管内皮細胞のモノレイヤーを作製することで、入り口と出口ができ内部の血管ネットワーク構造と接続させることでこの問題を解消できる。本研究では前章で作製した血管ネットワークが全体的に接続し、更に入り口と出口がある血管ネットワークができるかどうかを評価する。評価の手法はセルカルチャーインサートを用いて液量差を作りし、圧力をかけることで、培地中に見濁した蛍光ビーズが血管ネットワーク内に進入するかどうかを評価する[6]。

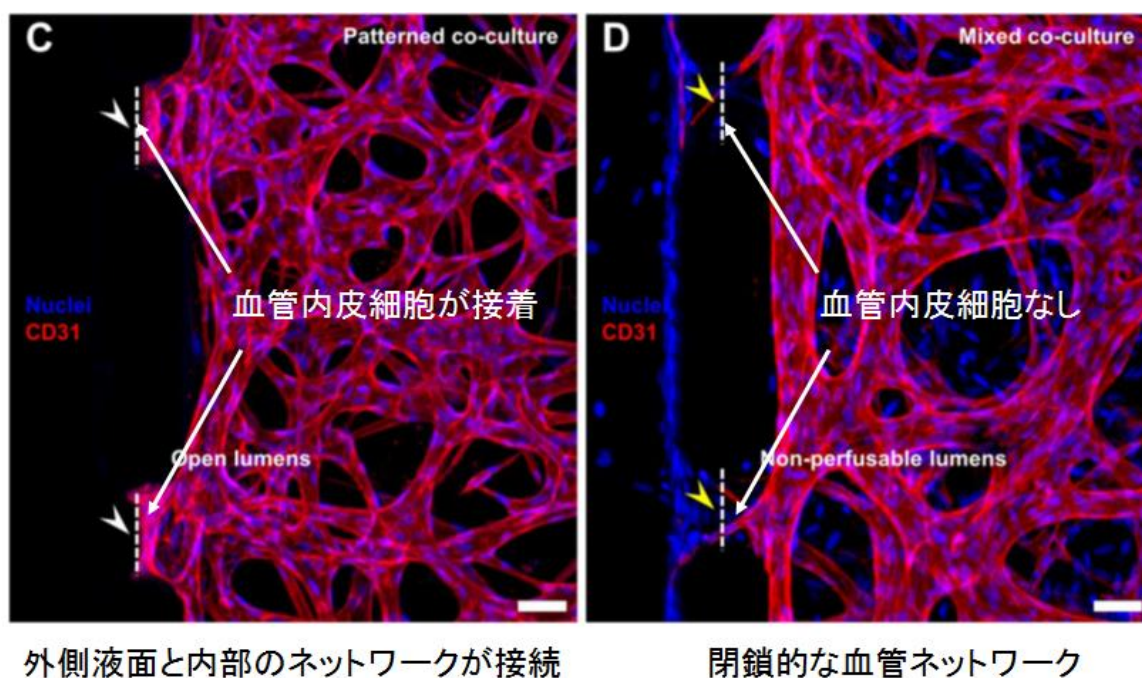


Figure 3.5 参考文献：ゲル壁面に血管内皮細胞のレイヤーを形成させることでハイドロゲル内部の血管ネットワークの外面と接続[1]

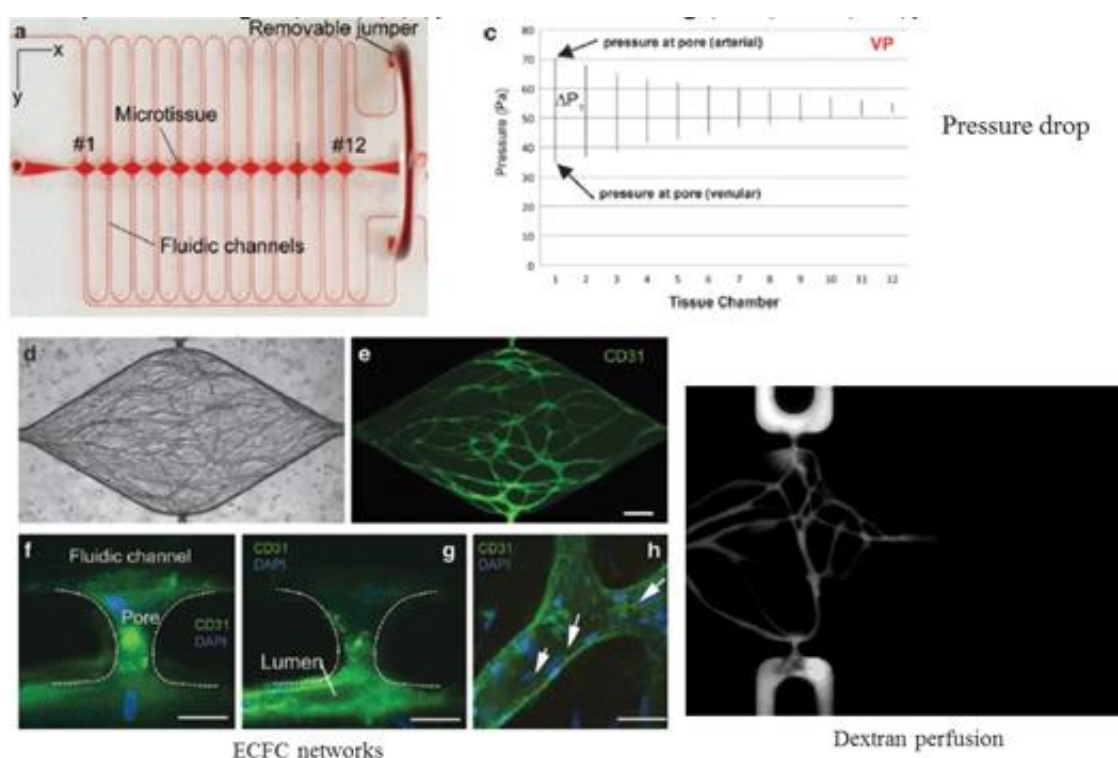


Figure 3.6 参考文献：圧力降下を利用して、血管内皮細胞にデキストラン溶液を自律的に送液。[6]

3.3.3 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)
- ・セルカルチャーインサート(BD Falocon) 6 well type 0.1 μm, 8 μm

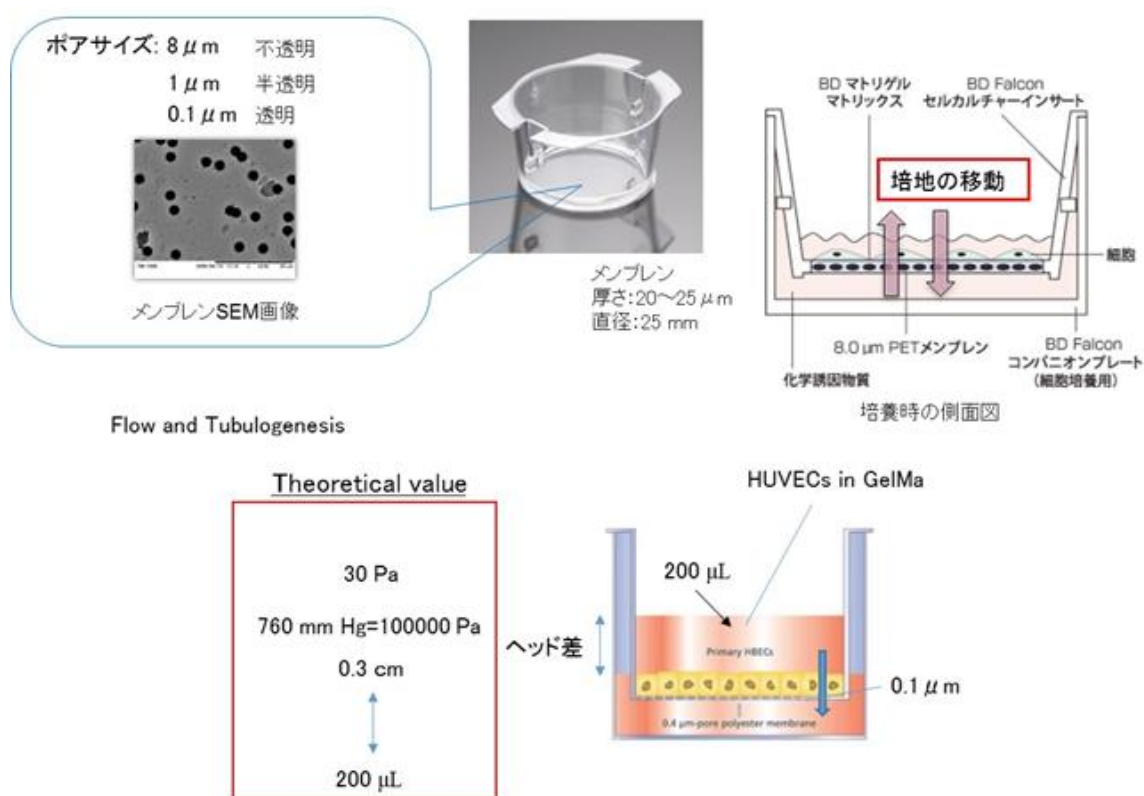


Figure 3.7 コラーゲンゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワーク

【実験手順】

血管内皮細胞の包埋

GelMa 溶液を調製し、そこに HUVEC (P4) (2.0×10^6 cells/ml) と MSC を 1.0×10^5 cells/ml を包埋して、セルカルチャーインサート、もしくはガラスボトムディッシュ上で培養する。(液量は 500 μ L で統一)、培地量は上 3ml, 下 3ml。最大 150Pa。静水圧は時間とともに解消されるが、20 時間以上 30Pa 以上を維持できる。

ハイドロゲル内の血管構造の観察

培養 3 日目で細胞骨格、細胞核を染色後、蛍光顕微鏡観察もしくは共焦点顕微鏡観察する。

3.3.4 実験結果と考察

カルチャーインサートを使ってヘッド差をかけながら培養したところ、静水圧をかけた場合、かけなかった場合、コントロール (ガラスベースディッシュ) で血管内皮細胞のネットワーク形成に大きな違いが見られなかった。どの場合であっても、非常に密な血管ネットワークを形成していた(Fig. 3.8)。このときのガラスベースディッシュ上の GelMa を共焦点顕微鏡で精密に観察した(Fig. 3.9)。培養か

ら約3日後に美しい血管ネットワークを形成し、その血管ネットワークはゲル全面に広がり、ゲルの厚さである 100-150 μm のすべての深さ方向にネットワークが広がっていた。また、血管構造が管腔構造でつながっているエリアは全長で 5mm を超えているものもあった。**Fig. 3.9** 右下の血管構造がコネクションされているエリアを示す。血管内皮細胞のネットワークを拡大した写真が **Fig. 3.11** である。写真のように非常にきれいなネットワークを形成している。このネットワークは 10-100 μm の直径で様々な口径の管腔構造が存在していた。10-20 μm の管腔構造は1細胞が足を伸ばした中が空洞になっていた。30 μm 程度の管腔構造は2つの細胞が向いあわせになって筒を形成し、それ以上の 50-100 μm の管腔は複数個（5-10 個）程度の細胞が集まって管腔を形成していた。ネットワークの断面を示した写真が **Fig. 3.12** である。この写真より HUVEC が作るネットワーク構造は確実に管腔構造になっていることが分かる。また、共焦点顕微鏡観察によって解析したところ、15-20 μm 程度から管腔構造になっている確率が増えネットワークの構造が 25-30 μm を超えるとほぼ確実に管腔構造になっていた。

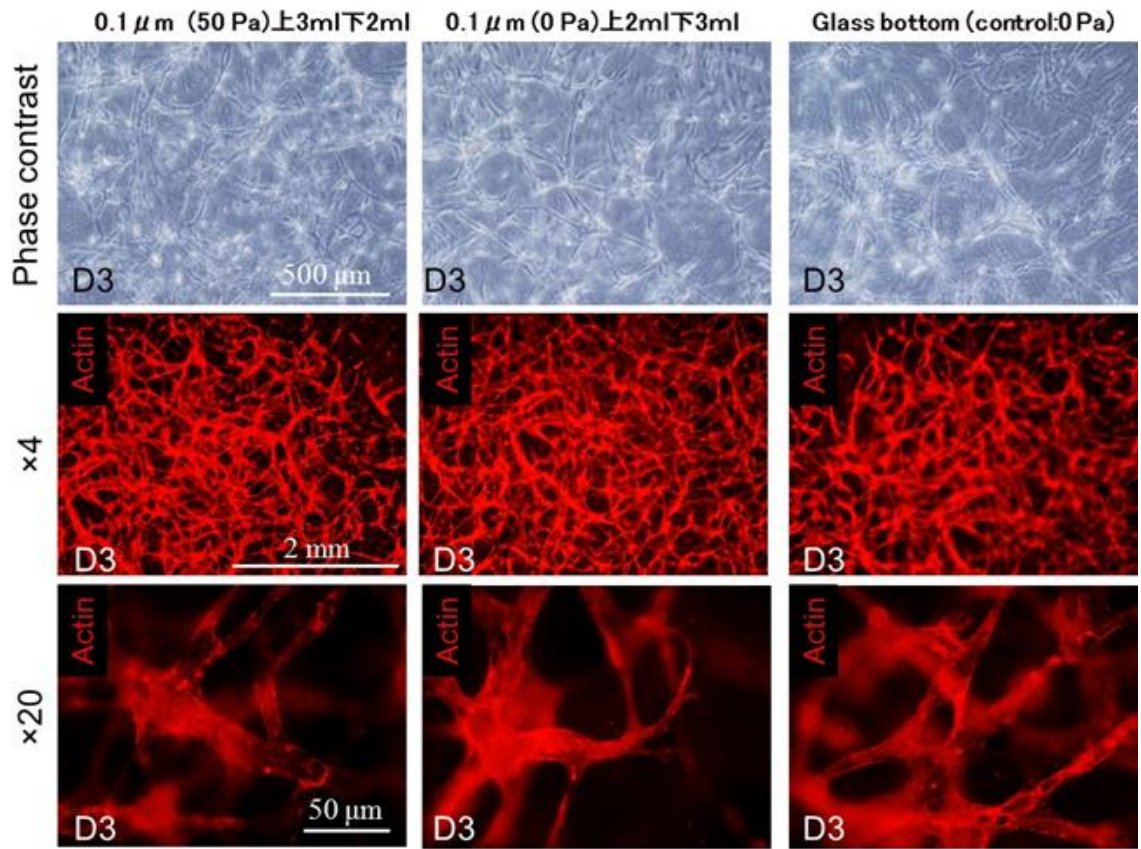


Figure 3.8 セルカルチャーインサートを用いたゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワーク

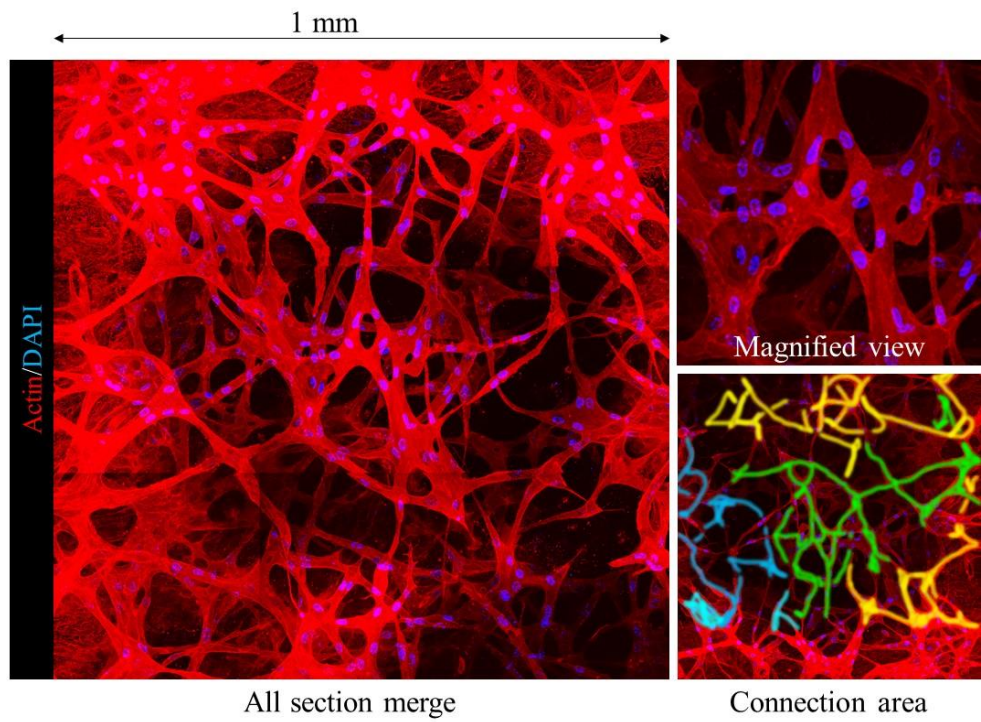


Figure 3.9 共焦点顕微鏡によるゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワークとコネクションエリア(D3)

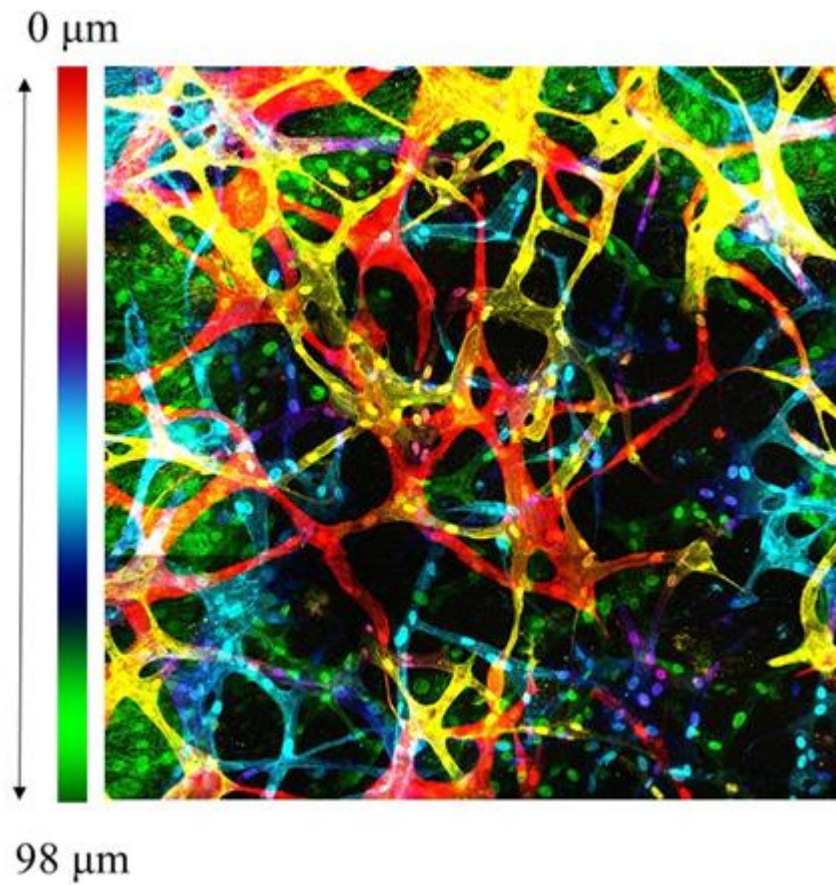


Figure 3.10 血管ネットワークの深さ方向の分布、100 μ m 以上の厚みに渡って血管ネットワークが伸長している。

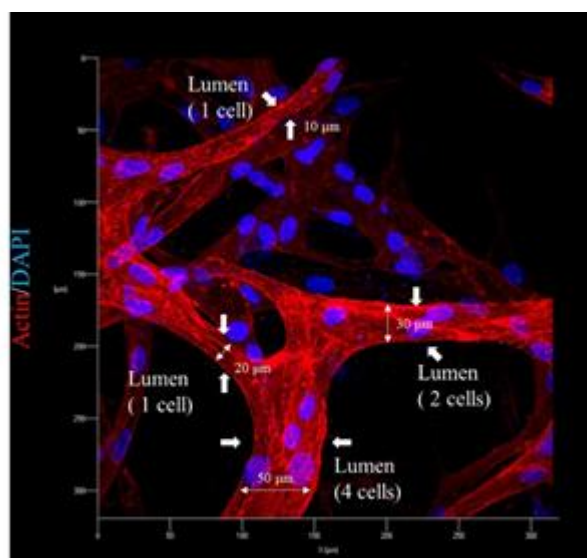


Figure 3.11 共焦点顕微鏡によるゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワーク

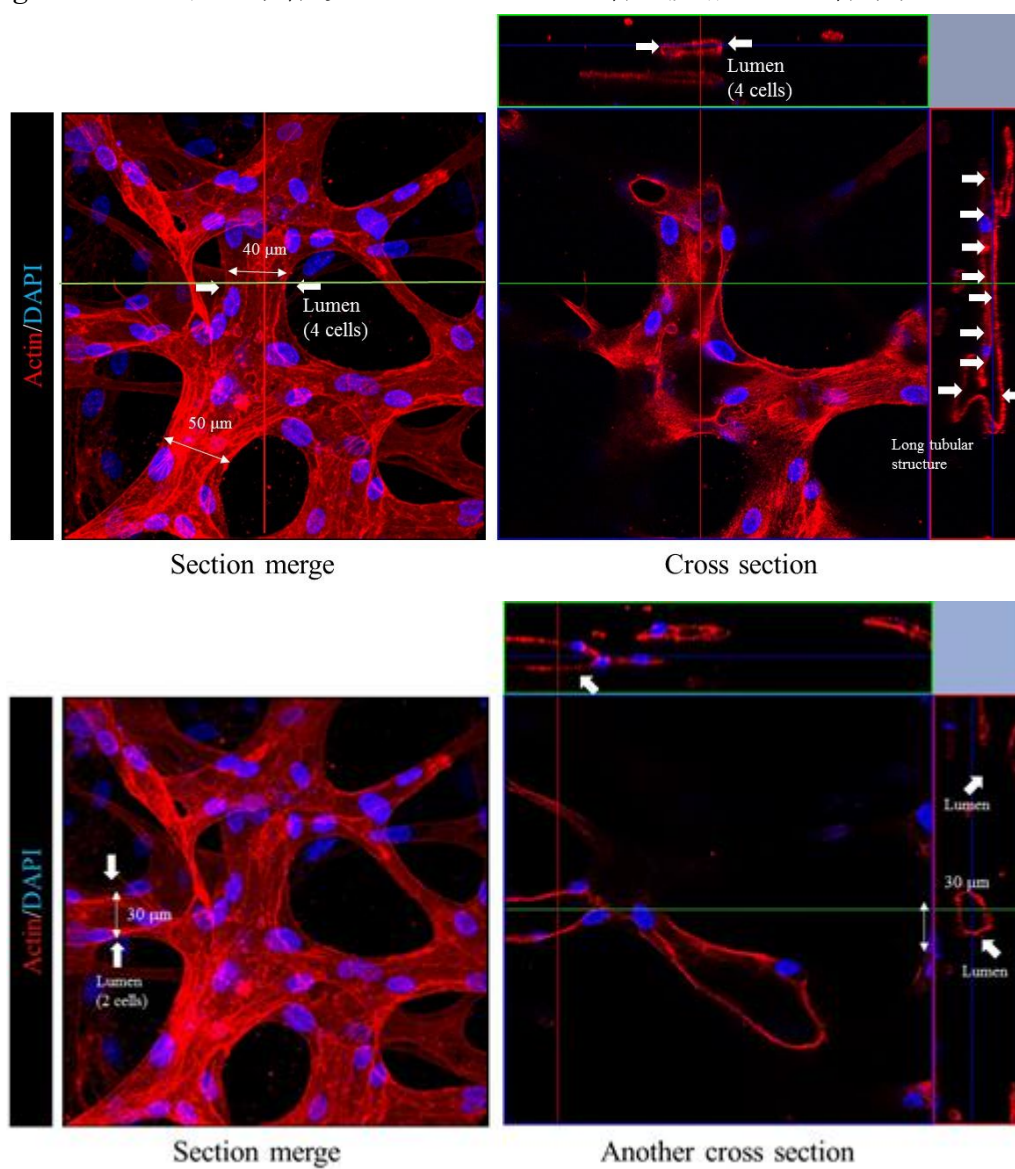


Figure 3.12 血管ネットワークの断面像と管腔構造

3.3.5 実験手順 2 蛍光ビーズ送液

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)
- ・セルカルチャーインサート(BD Falocon) 6 well type 0.1 μm, 8 μm
- ・Green FITC conjugated micro beads (invitrogen) diameter=1μm

【実験手順】

血管内皮細胞のモノレイヤー形成（下面）

セルカルチャーインサートに HUVEC を 2×10^5 cells/well の密度で播種し、24 時間培養を行う。これによりセルカルチャーインサート底面に血管内皮細胞のモノレイヤーを形成させる。

血管内皮細胞の包埋

GelMa 溶液を調製し、そこに HUVEC (P4) (2.0×10^6 cells/ml) と MSC を 1.0×10^5 cells/ml を包埋して、セルカルチャーインサート、もしくはガラスボトムディッシュ上で培養する。(液量は 500 μL で統一)、培地量は上 3ml, 下 3ml。最大 150Pa。静水圧は時間とともに解消されるが、20 時間以上 30Pa 以上を維持できる。

血管内皮細胞のモノレイヤー形成（上面）

再び、包埋したゲルの上にHUVECを 2×10^5 cells/wellの密度で播種する。これによりセルカルチャーインサート上面にも血管内皮細胞のモノレイヤーを形成させる。

ハイドロゲル内の血管構造の培養

培養 3 日目セルカルチャーインサートにて培養を行う。

蛍光ビーズの送液

セルカルチャーインサートの上側の培地に蛍光ビーズ溶液を 1%加え、24 時間静水圧をかけながら培養をする

ハイドロゲル内の蛍光ビーズと血管ネットワークの観察

培養後、細胞骨格、細胞核を染色し、共焦点顕微鏡で蛍光ビーズを観察する。

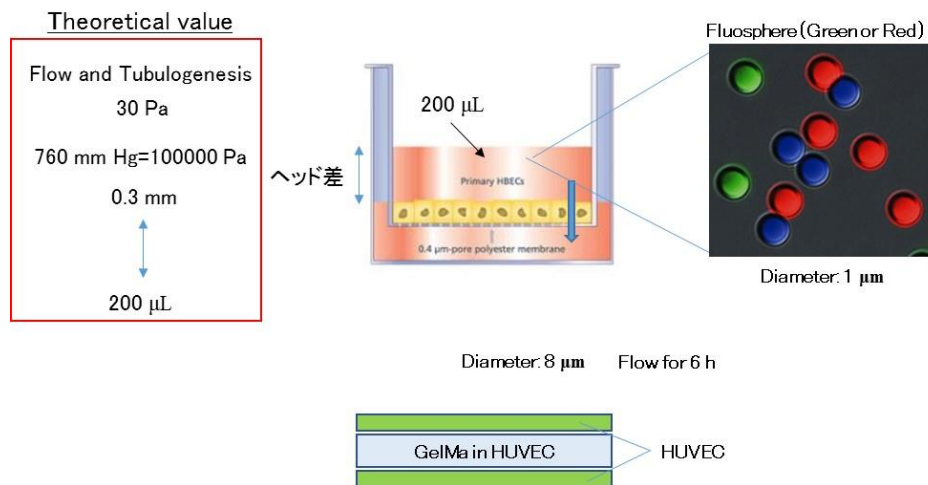


Figure 3.13 蛍光ビーズを用いた血管内皮ネットワークの送液テスト

3.3.6 実験結果と考察

カルチャーインサートを使ってヘッド差をかけながら培養し蛍光ビーズをカルチャーインサート上面に懸濁したところ血管ネットワークの内部に蛍光ビーズが侵入している様子が観察できた。(Fig. 3.14)。侵入した深さは、100 μ m 程度であった(Fig. 3.15)。これはセルカルチャーインサート上に敷いたゲルの容量と厚さを考慮すると、上から侵入した蛍光ビーズはかなり下側まで侵入していることが分かる。また、下側の培地からも蛍光ビーズを観察することができた。つまり、上面と下面に血管内皮細胞のモノレイヤーを形成させたことで、ゲル内の血管ネットワークは上面と下面と繋がり、上面に懸濁した蛍光ビーズが侵入できたと考えられる。この結果より、これまで作製してきた血管構造は、蛍光ビーズが通るほど管腔構造が発達することを示せた。

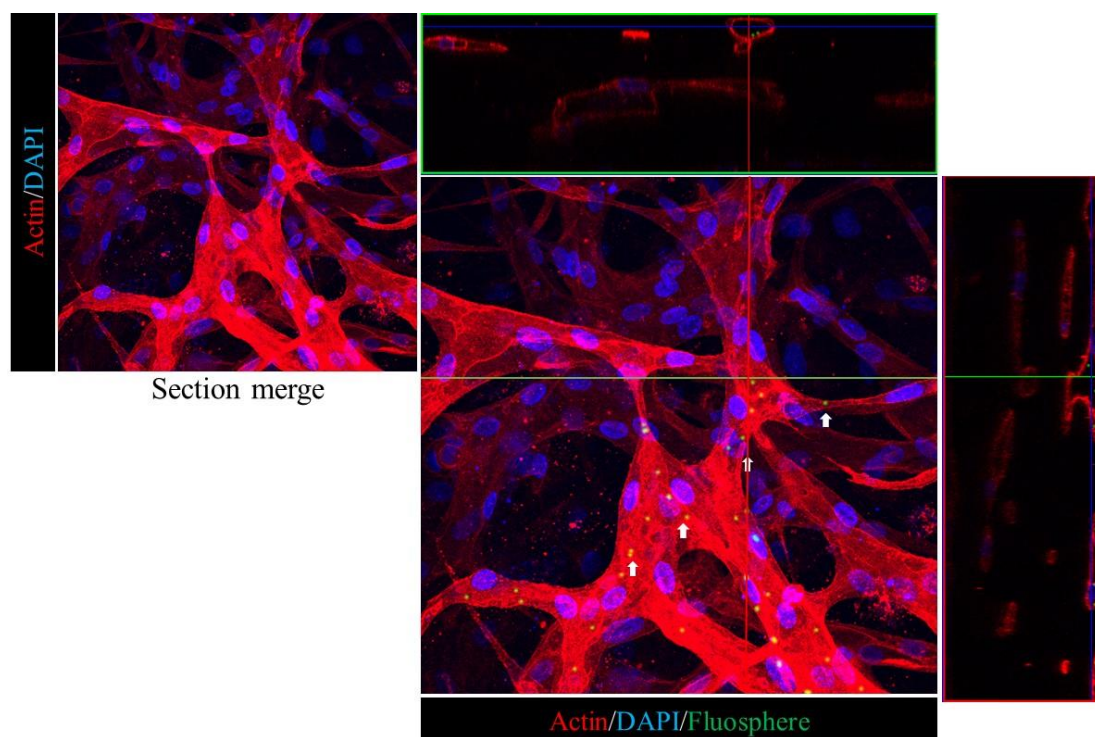


Figure 3.14 静水圧差による蛍光ビーズの微小血管構造への侵入

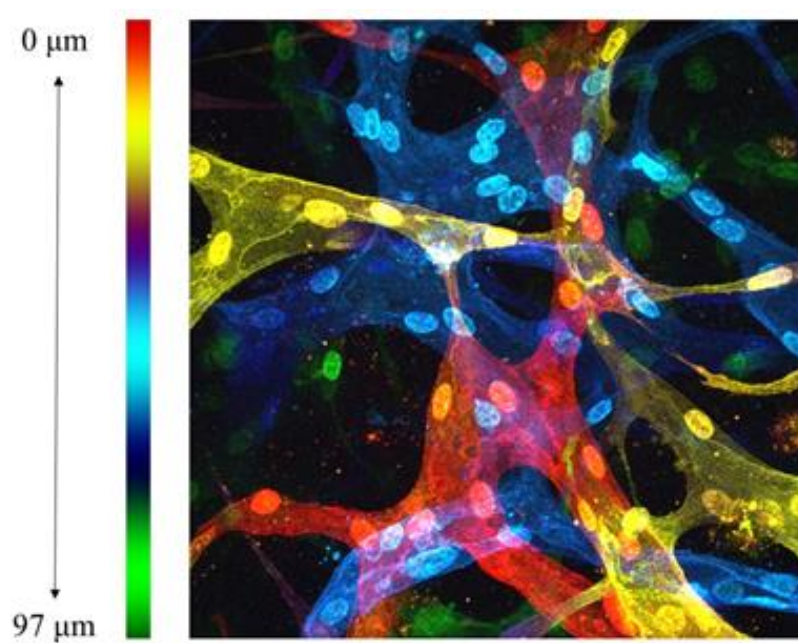


Figure 3.15 蛍光ビーズの深さ方向への侵入距離

3.4 送液可能で分岐構造を備えた血管構造の作製

3.4.1 本節の目的

これまでに、ハイドロゲル内に成熟した血管構造を作製することに成功してきた。この節では、前章で行ってきた電気化学的な血管構造作製手法と 3 章で行ってきた自己組織的な微小血管構造の作製の知見を組み合わせることによって、本来の目的であった送液可能な血管構造と微小な血管構造を併せ持った組織を作製し、それらが高度に接続し合った分岐型の血管構造を持った組織体を作製する。

3.4.2 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)(P4), Lonza
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・Green FITC conjugated micro beads (invitrogen) diameter=1 μ m

ガラスキャピラリー洗浄

30~50 本のガラスキャピラリーを PDMS で作製した土台に垂直に差し込み、純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

Au/Cr 層のスパッタ

PDMS の土台にガラスキャピラリーを差し込んだ状態で、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分 30 秒間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 3 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

500 μ M RGD ペプチド溶液にガラスキャピラリーを 12 時間浸漬させた後、純水で洗浄した。

金線の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金線をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間

浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

金線を架橋アルブミンコートディッシュに 5~10 本入れ、EBM-2 に 7.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁した HUVEC(P3)を 1 ディッシュ当たり 2 mL 量、つまり 1.5×10^5 cells/dish の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で 37℃、5% CO₂-Air のもとで、金線周囲を完全に覆うまで、3~4 日間培養した。

培養チャンバーの作製

厚さ 2 mm のアクリル板をレーザー加工機で指定の形状に切断し、接着剤（アクリサンダー）を用いて、培養チャンバーを作製した。純水に一晩漬けた後、70%エタノールで滅菌して使用した。

金線の固定

培養した金線を PBS 溶液に一度漬けてから、表面の細胞を乾燥させないように、アクリルの培養チャンバーに 2 本固定した。このとき、細胞を傷つけないように注意しながら差し込んだ。

GelMa 溶液のゲル化

GelMa 溶液をチャンバー内に流し入れ UV 光を 6.9 mW/cm² の出力で 60×2 秒当ててゲル化させた。共培養時には、この時 HUVEC(P4)を 2×10^6 cells/ml、MSC(P12)を 1×10^5 cells/ml、の細胞密度で包埋した。

電位の印加

金線を作用極、銀／塩化銀線を参照極、白金板を対極として、GelMa 内に差し込むことで 3 電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 V を 5 分間印加した。

血管様構造の形成

電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、PDMS チャンバーから金線を丁寧に真っ直ぐ引き抜くことで、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

送液培養

血管様構造を形成の後にポンプに接続して送液培養を 3 日間行った。

ビーズ送液テスト

培養後、アクチン、細胞核を染色し PBS に懸濁した FITC 蛍光ビーズを送液する。それを蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡でタイムラプス観察、動画撮影をする。

3.4.3 実験結果と考察

電気化学的な手法を用いて直径 500 μm の血管構造を作製し、その間を繋ぐように微小な血管構造を血管内皮細胞の自己組織的な能力を用いて作製した。その結果、送液培養から 3 日で **Fig. 3.16** のように非常に密な血管網構造をもった血管構造を作製することができた。この構造自体は非常に早い段階（24 時間）で形成されていた。その後、さらに培養することで密なネットワークが形成された。また、電気化学的に作製した血管構造の HUVEC とゲル内に播種した HUVEC は細胞間結合を結び、ネットワーク構造が繋がっているように見える。ゲル中の血管ネットワークの直径は 20-30 μm 程度の太さであり、最大 100 μm 程度の血管構造もあった。血管構造を固定、染色を行った後、この構造に、蛍光ビーズが入った PBS を送液した(**Fig. 3.17-19**)。2 本の血管構造に同じ方向に同速度で蛍光ビーズを送液したところ、並行する太い血管構造にはビーズが漏れることなく流れていた。しかし、2 本の太い血管構造の間に形成された微小血管ネットワークにビーズが流れることはなく、数個の蛍光ビーズがネットワークの中に入るだけにとどまった。これは、2 つの血管構造の間には圧力差はなく、太い血管構造のほうが流れやすいため、微小血管構造には流れなかったと考えられる。この時、血管の中心部は非常に流れが早い、血管壁周辺では非常にゆっくりとした流れであることが確認でき、流体力学の基本原理と一致する。ここで、この状態のまま、上側の出口を塞いだ所、2 本の血管構造をつなぐ HUVEC の中を上から下方向へビーズが流れだした。このようにして、2 本の血管構造間に圧力差をつけることで血管構造から微小血管構造へブリッジするようにして流れた。また、このようにして作製した血管構造がどのような細胞間結合を持っているのかを免疫蛍光染色を行い解析したところ、微小ネットワークは細胞間で VE-cadherin による接着で保たれていた。(Fig. 3.20-22)

3.4.4 本節のまとめ

このようにして、P3 または P4 の HUVEC を使い細胞播種密度を最適化することによって、非常に密な管腔構造になっているネットワークを作製することができた。この微小な血管構造はゲル内の酸素拡散を飛躍的に向上させ、ハイドロゲル内に高密度に肝細胞のような酸素消費量の多い細胞を包埋した際もその細胞に、効率よく酸素を運搬することができ、送液可能な太い血管構造からそれに必要な大量の培養液を高いせん断応力がかかることなく流すことができると考えている。

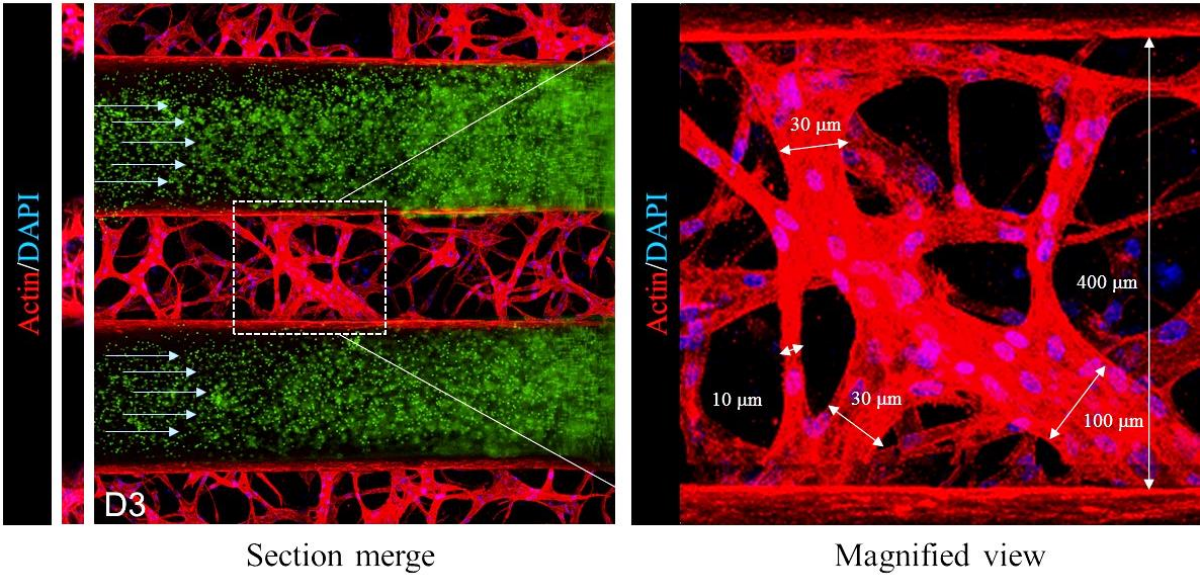


Figure 3.16 電気化学的な血管構造作製手法と自己組織的な微小血管構造作製手法を組み合わせた。複雑分岐血管ネットワークの作製

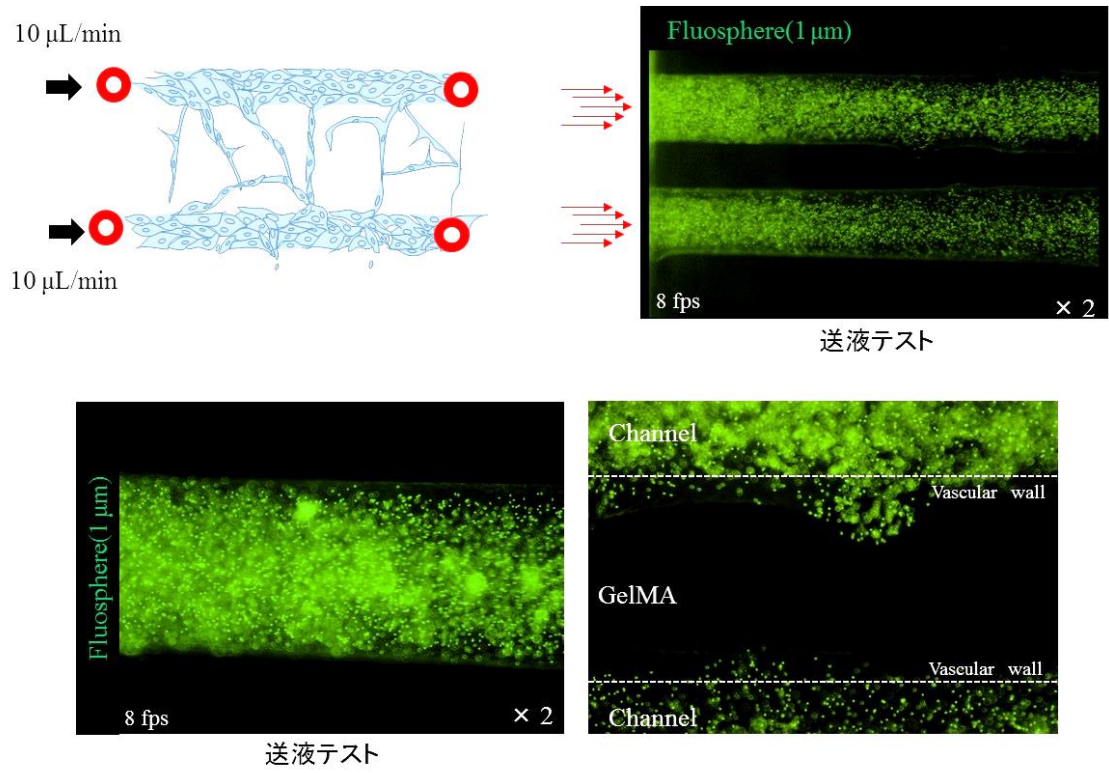


Figure 3.17 微小血管構造への送液、圧力差なし

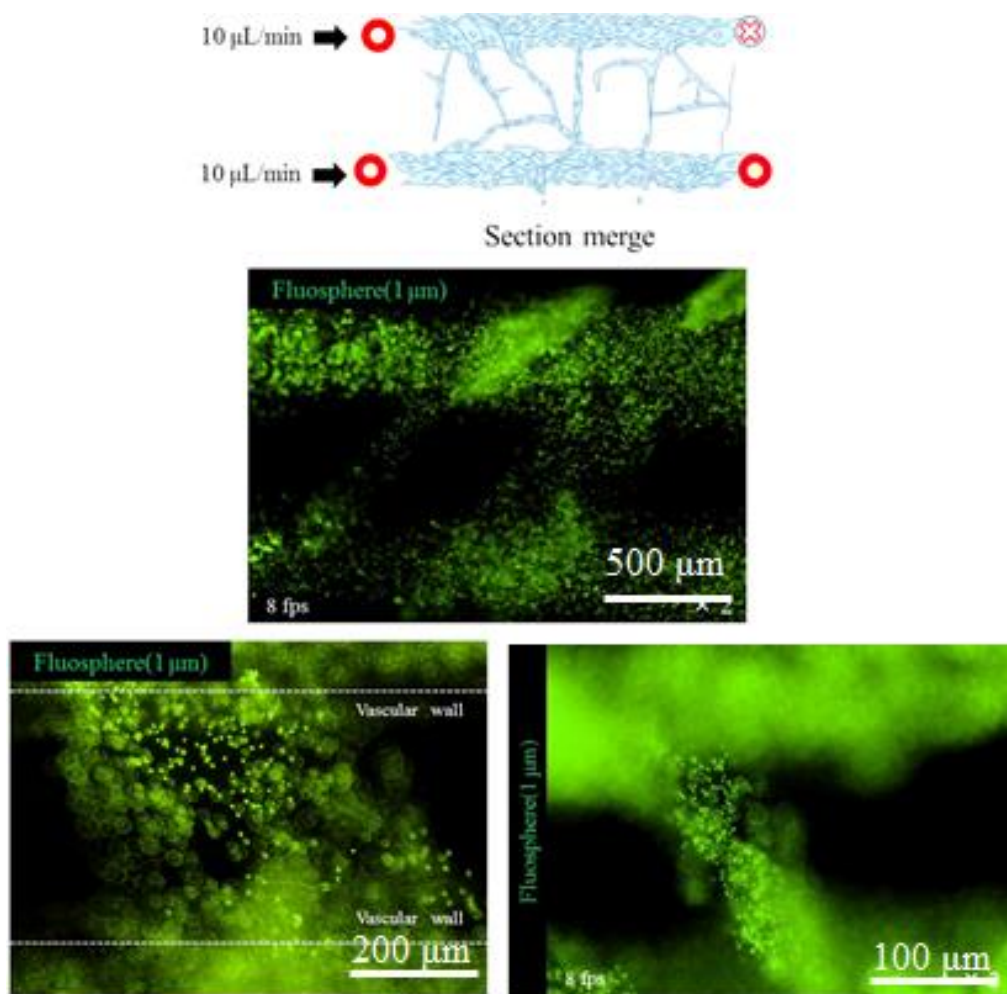


Figure 3.18 微小血管構造への送液、圧力差なし

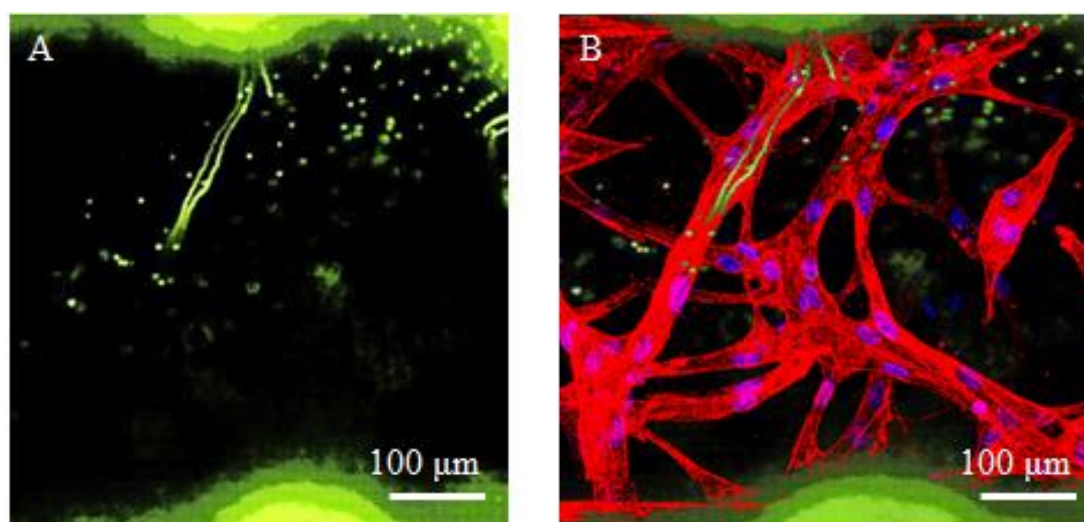


Figure 3.19 圧力差をかけた時に微小血管構造へと流れこむ蛍光ビーズ

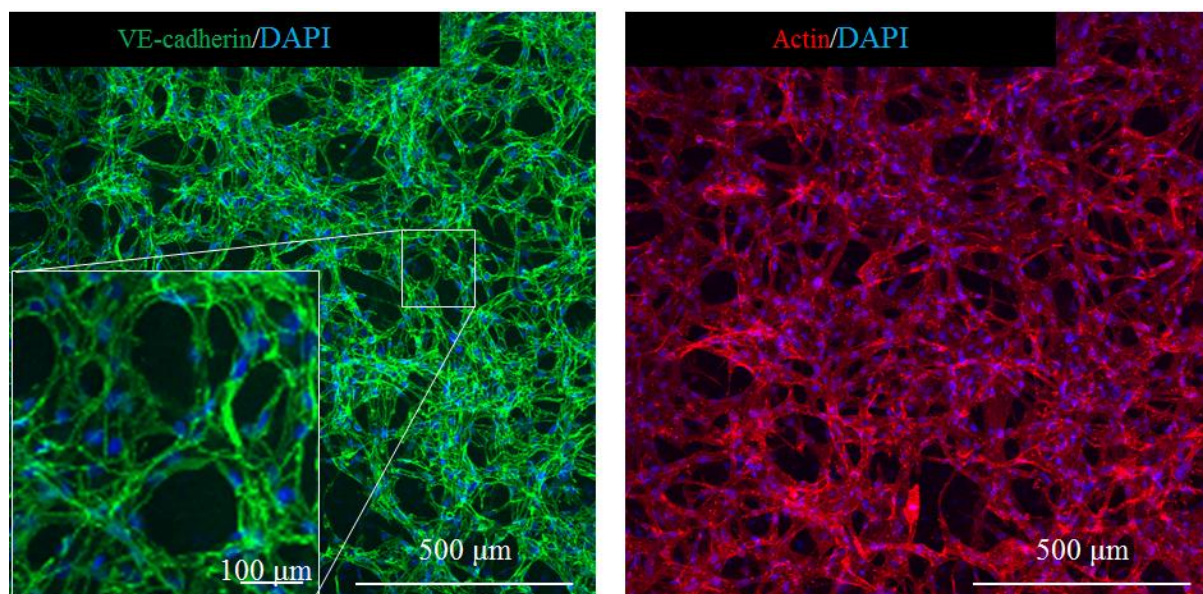


Figure 3.20 微小血管構造の細胞間結合(VE-cadherin)

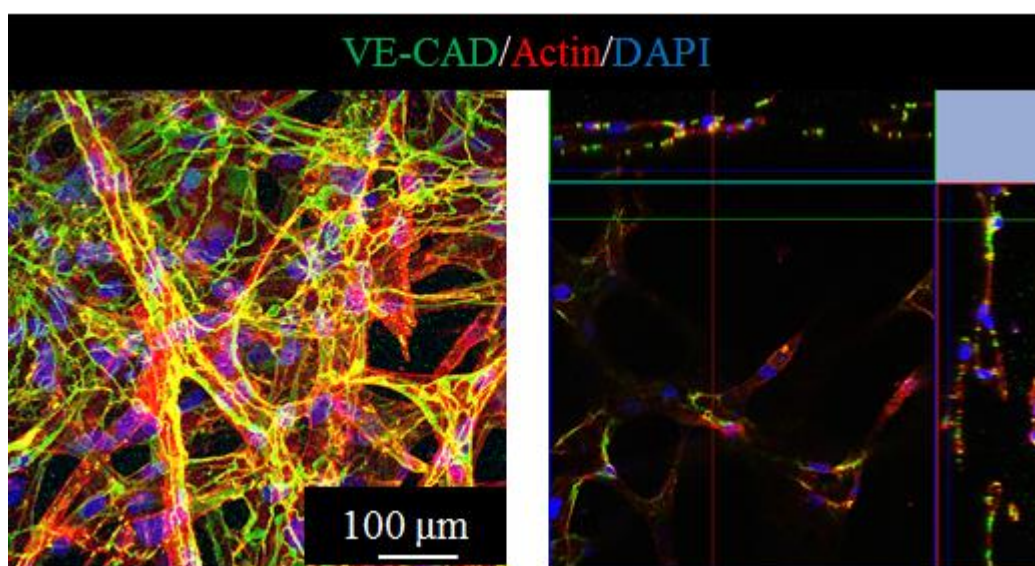


Figure 3.21 微小血管構造の細胞間結合(VE-cadherin)

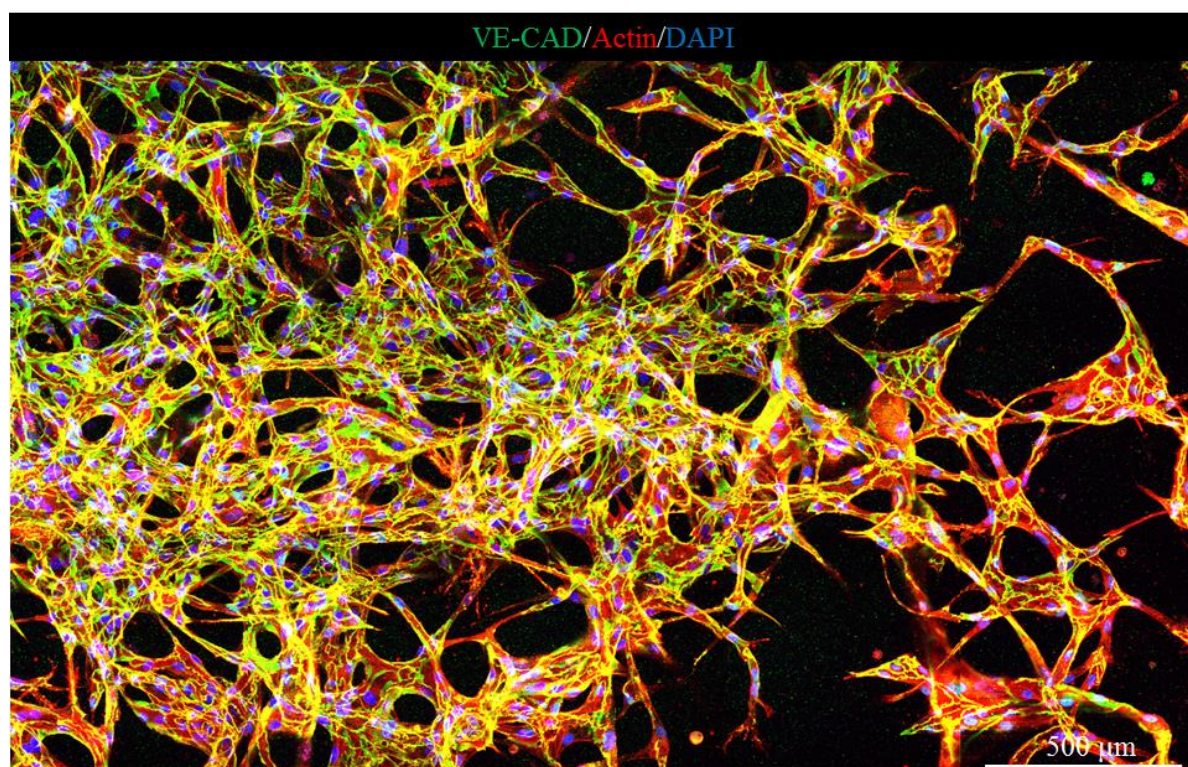


Figure 3.22 圧力差をかけた時の微小血管構造の細胞間結合と血管ネットワーク (VE-cadherin)

3.5 本章のまとめ

本章では電気化学を用いた血管構造の作製方法だけでは不十分であった、微細な毛細血管に当たる血管構造の作製手法について記載した。まず、GelMa 内にどのような条件で血管ネットワークが誘導できるかの検討を行った。その結果、血管内皮細胞は継代数が 4 もしくは 5 の細胞を 2.0×10^5 cells/ml 観葉系の幹細胞を 1.0×10^5 cells/ml の濃度で濃度 5% の GelMa に作製する条件が最も適していた。また、セルカルチャーインサートインサートを用いた実験では、ハイドロゲルの周りにモノレイヤーを形成させることで、内部の血管ネットワークと外部の培地エリアが接続させることを確認し、実際に培地に懸濁した蛍光ビーズが血管ネットワーク内に侵入している様子を共焦点顕微鏡で観察した。最後に、この知見を活かし、前章で確立した電気化学的に血管構造を作製する手法と組み合わせ、送液可能な血管構造と、組織の隅々まで酸素を運ぶ微小な血管ネットワークを兼ね備えた、複雑分岐血管構造をハイドロゲル内に作製した。この微小な血管ネットワークへは隣り合うチャンネルに圧力差を付与して送液することで、血管間を横切るような流れが発生し、微小血管構造内にビーズが流れるのを確認した。次章では、ハイドロゲル内に肝臓の細胞を高密度で包埋した、微小血管構造の有用性と、送液可能な血管構造の重要性を証明していく。

3.6 参考文献

- [1] Kim S, Lee H, Chung M, Jeon NL. Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab on a Chip*. 2013;13:1489-500.
- [2] Lubarsky B, Krasnow MA. Tube Morphogenesis: Making and Shaping Biological Tubes. *Cell*. 2003;112:19-28.
- [3] Kamei M, Brian Saunders W, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*. 2006;442:453-6.
- [4] Kalashnik L, Bridgeman CJ, King AR, Francis SE, Mikhalovsky S, Wallis C, et al. A cell kinetic analysis of human umbilical vein endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2000;120:23-32.
- [5] Baldwin J, Antille M, Bonda U, De-Juan-Pardo E, Khosrotehrani K, Ivanovski S, et al. In vitro pre-vascularisation of tissue-engineered constructs A co-culture perspective. *Vascular Cell*. 2014;6:13.
- [6] Moya ML, Hsu Y-H, Lee AP, Hughes CCW, George SC. In Vitro Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2013;19:730-7.

第四章

iPS 細胞由来肝細胞を用いた 3D 肝組織の構築

4.1 はじめに

前章までに、電気化学的な手法と自己組織的な血管ネットワーク形成能を組み合わせることによって、ゲル組織内に、血管ネットワークが張り巡らされた複雑分岐血管構造を短時間で作製する手法を確立した。更に、この技術を用いて、実際に 3D 組織作製に適用可能であるかを評価した。そのためには、これまでの、血管内皮細胞と間葉系幹細胞に加えて、実質細胞を加えて組織構築を評価するのが妥当であろう。本研究では、肝臓の組織作製にターゲットを絞り、肝実質細胞を加える事によって 3D 肝臓組織の作製を目指す。一方で、どのような細胞の状態でハイドロゲルに組み込み組織化するかは様々な研究がなされているがまだ議論の余地が残されている。本研究では、ハイドロゲルに組み込む際に、細胞がバラバラのシングルセルの状態に入れるのではなく、スフェロイドを形成させた後にハイドロゲルに組み込むのが最適ではないかと考えた。肝細胞は、モノレイヤー培養に比べてスフェロイド様にして培養すると、その代謝活性や、薬物代謝活性が上昇するという報告があるためである[1][2]。この章では、ハイドロゲルに組み込む前段階として、まずスフェロイドの形成についての取り組みについて報告する。さらに、どのような細胞を使うかも重要なポイントである。本研究では、まずヒト肝がん細胞とヒト初代肝細胞を用いてスフェロイドを形成した後、血管構造を備えたハイドロゲルに組み込み送液培養をおこなう。その後 iPS 細胞から誘導した肝細胞を用いて同様の実験を行い、最終的に iPS 由来肝細胞が高密度に充填され血管構造を備えた 3D 肝臓類似組織体を作製した。

4.2 肝スフェロイドの形成手法

4.2.1 はじめに

ハイドロゲル内に、どのような状態もしくは、どのような細胞密度で実質細胞を充填するのかは組織作製において重要な検討事項であるが、細胞の機能という観点から形態としてはスフェロイドにして充填するのが良いと期待できる。本節では現在、存在する様々なスフェロイド作製方法について検討した後本研究にあった最適なスフェロイド作製方法を調査する。本研究では、肝細胞自体の活性が高いこと、低酸素状態を引き起こさないこと、そして一度に大量の数のスフェロイドを作製できるといった条件が必要になる。

4.2.2 本節の目的

本節の目的は、スフェロイドの作製方法を検討し、前述の 3 つの観点から最適なスフェロイド作製方法を調査することである。3 つの作製方法はそれぞれ、スミロン Prime surface 96well、PDMS-Oxychip、kuray Elplasia を用いた。

4.2.3 スフェロイド

一般に、細胞を生体から回収し培養をする際には、プラスチックの培養皿底面に細胞を接着させる

ことによって、細胞を維持する。しかし、これは本来の生体内の状態とは大きくかけ離れている。生体内は、このような硬い基盤に単純にくっついているわけではなく、その殆どを細胞もしくは細胞外マトリックスで囲まれ、三次元的に培養されている。一方で培養皿を用いて単純に培養するのみでは、細胞は培養皿底面に広がりモノレイヤーを形成するのみで、生体のような塊状で培養することは困難である。そこで、このような生体に近い形且つ、簡単に作製できる球状の組織体がスフェロイドである。スフェロイド状にして培養すると、アルブミンの合成能が上昇したり、アンモニア代謝速度が上昇したりすると報告されており、肝細胞研究においてスフェロイドはシングルセルより活性が高いという共通の認識がある[3]。本研究でもその知見を取り入れ、ハイドロゲルにはシングルセルではなくスフェロイドの肝細胞を充填し、3D 肝臓組織作製を行うとした。

4.2.4 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・3次元造形装置：MDX-540s
- ・共焦点顕微鏡：LSM700

【試薬】

- ・スミロン Prime surface 96well(住友ベークライト)
- ・Pluronic F-127 (SigmaAldrich)
- ・ヒト肝がん細胞 HepG2 (Hepatic carcinoma cells)
- ・DMEM high glucose (Sigma)
- ・Fetal Bovine Serum (Gibco)
- ・PDMS・ウシ血清アルブミン：BSA, (Sigma)



Figure 4.1 スフェロイド形成プレート SUMIRON

- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)

【実験手順1、スミロン・スフェロイド形成】

HepG2 の播種

Prime surface に HepG2 を播種する。細胞数は 100 cells/well, 200 cells/well, 400 cells/well, 800

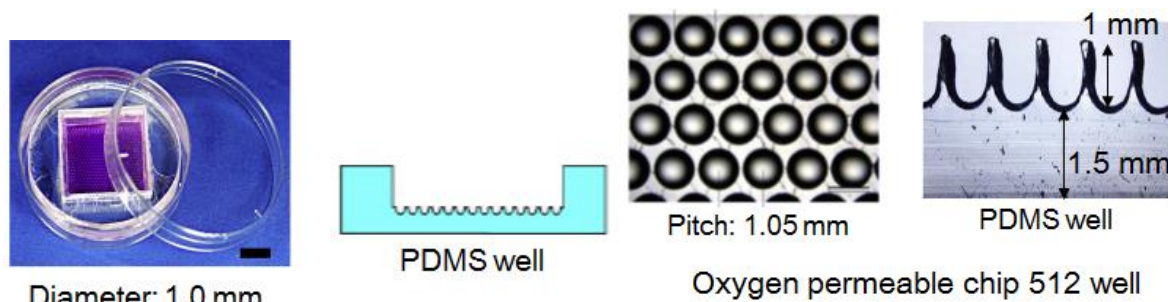


Figure 4.2 PDMS を用いた酸素透過性の自作スフェロイドプレート



Figure 4.3 Kuray スフェロイド作製プレート Elplasia®

cells/well, 1600 cells/well, 3200 cells/well と初期の細胞数を変えて実験を行った。

スフェロイド形成過程の観察

培養 3 日目までのスフェロイド形成過程とスフェロイド直径の変化を位相差顕微鏡で観察した。

【実験手順 2、PDMS 酸素透過性スフェロイドプレート】

ポジティブモールドの作製

アクリルを 3 次元造形装置を用いて凸加工をおこない、PDMS の鋳型を作製する。凸構造はスフェロイドウェルにあわせて、直径 500 μm 高さ 300 μm とする。

PDMS ウェルの作製

アクリルと 6 センチディッシュを組み合わせたものを鋳型としてそこに PDMS と硬化剤を 1:1 で混合したものを、流し込み 80°C オープンで 1 時間ベークを行い硬化させる

オートクレーブ

鋳型から取り出した PDMS プレートを、2 回オートクレーブ滅菌を行う。

Pluronic F-127 の修飾

PDMS 表面を細胞が付着しない表面にするために、Pluronic F-127 を PDMS ウェル内に 2ml 導入し 6 時間インキュベーターでインキュベートした。その後、PBS で 3 回洗浄を行う。Pluronic F-127 は細胞毒性があるため、念入りに洗浄を行う。

HepG2 の播種

PDMS プレートに HepG2 を播種する。細胞数は 2.5×10^5 cells/well 1 プレートあたり 512 個の well が配置されている。

スフェロイド形成過程の観察

培養 3 日目までのスフェロイド形成過程とスフェロイド直径の変化を位相差顕微鏡で観察した。

生死染色

FDA/EB を用いて生死染色を行った。

【実験手順 3、kuraray, Elplasia によるスフェロイド形成】

HepG2 の播種

Elplasia RB500 に HepG2 を 1.0×10^6 cells/well の密度で播種する。1well あたり 3000 個の well が配置されており、一枚のプレートで 18000 個のスフェロイドを作製することができる。

スフェロイド形成過程の観察

培養 3 日目までのスフェロイド形成過程とスフェロイド直径の変化を位相差顕微鏡で観察した。

4.2.5 実験結果と考察

実験結果より、Primesurface を用いた場合、異なる細胞数で播種することで大きさを制御しながらスフェロイドを作製することに成功した(**Fig. 4.4**)。また、回収したスフェロイドを回収し染色したところ、すべての細胞が生存していることを確認した(**Fig. 4.5**)。送液培養へ組み込む際には、組織のサイズと酸素拡散などの観点から、200 μ m 前後のスフェロイドを作製したいと考えている。今回の結果から、初期細胞数を 200-400 cells/well で播種することにより、3-4 日でスフェロイドを形成することがわかった。このスフェロイド形成法の利点は、1 スフェロイドずつ区切られているため 1 つずつ細胞を分析したり、様々な条件をふることができることだと考えている。一方で、一度に同種類のスフェロイドを大量に作製する用途には向いていない。1 プレートで 98 のスフェロイドしか作製することができなく、細胞の播種やスフェロイドの播種に時間がかかるためである。PDMS プレートをを用いたスフェロイドの実験結果を **Fig. 4.6** に示す。この PDMS プレートをを用いた場合でも培養から約 3 日程度でスフェロイドを形成していた。また生死染色でもスフェロイドのすべての細胞が生きていることを確認した。培養 4 日経過した後に、回収したスフェロイドを **Fig. 4.7** に示す。この PDMS プレートの特徴は、Well 自体が PDMS で作製されているため、酸素供給が高いことにある。一般に、スフェロイドを培養すると、上側の培地面からの酸素拡散のみで細胞を生存するが、スフェロイド内部は低酸素状態になってしまい、ネクロシスを引き起こすことが報告されている[3]。一方で、この PDMS プレートは底面が PDMS であるために、下側からも酸素が供給されるために、スフェロイド表面の酸

素濃度を高い状態で維持することが可能となる。更に Primesurface の場合と比べて、1 つのチップに 512 個の well を備えているために、比較的多くのスフェロイドを一度に作製できるという利点がある。Elplasia を用いたスフェロイド作製の結果をに示す。このスフェロイドプレートを用いた場合では、細胞は凝集から 1 日後の凝集をおえ、3 日後には完全なスフェロイドを形成していた。播種密度と well 数から 1 つのスフェロイドは 2000—3000 このスフェロイドで構成されていると見積もられる。この手法の特徴は、1 プレートで一度に 18000 個ものスフェロイドを大量に作製できる点である。最終的に実質細胞として送液培養に組み込む際には $1.0 \times 10^8-9$ ほどの細胞 つまりスフェロイドにして 40000-50000 個のスフェロイドが必要になってくる。組織作製においては、Elplasia を用いたスフェロイド作製の利点は非常に大きい。

4.2.6 本節のまとめ

本節では 3 つのスフェロイド作製方法を検討した。Prime surface は播種密度に対してリニアにスフェロイドの大きさをコントロールできるが、一度に大量のスフェロイドを作製することはできない。PDMS プレートを用いた場合は一度に 512 このスフェロイドを作製でき、かつ PDMS の使用によって酸素濃度を高く保つことができる。Elplasia を用いた場合には、酸素濃度は高く維持できないものの、一度に 18000 個という大量のスフェロイドを作製することができる。今後の培養では、培養系に応じて PDMS プレートと Elplasia のスフェロイドプレートを使い分ける。

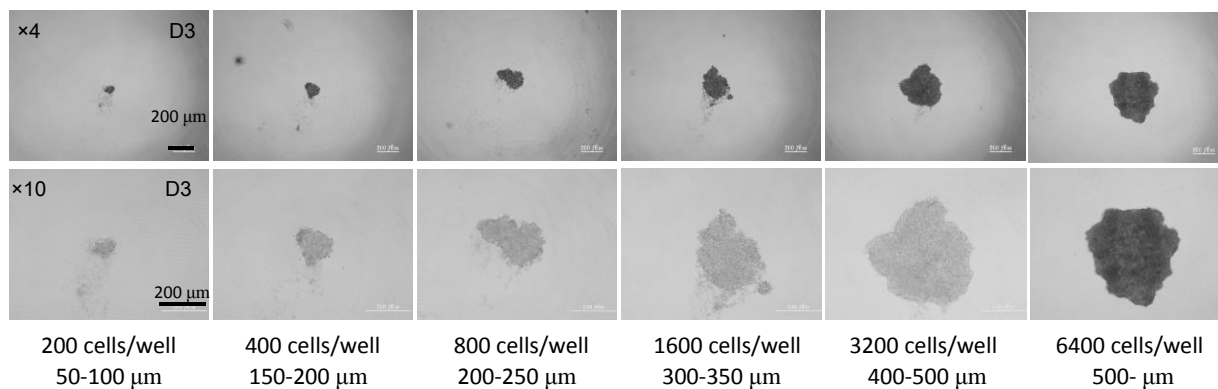


Figure 4.4 Prime surface を用いたスフェロイドの作製

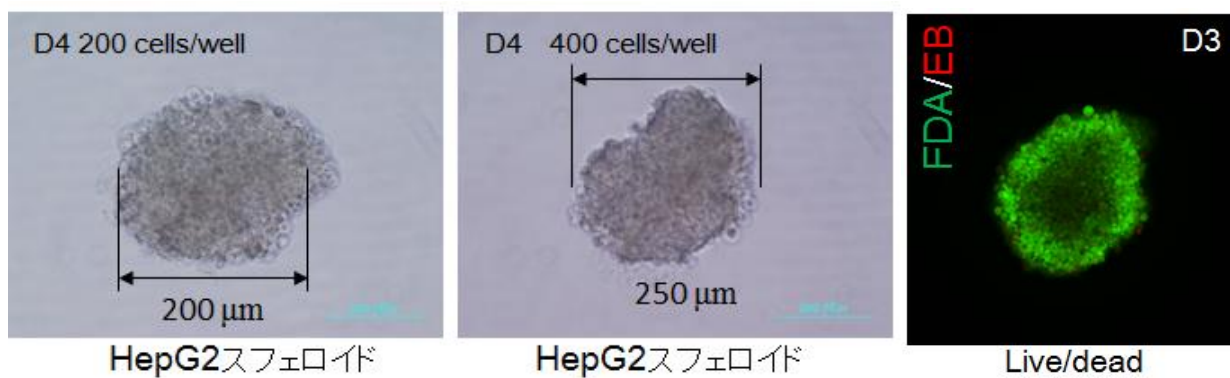


Figure 4.5 培養 4 日後のスフェロイドとスフェロイドの生死染色

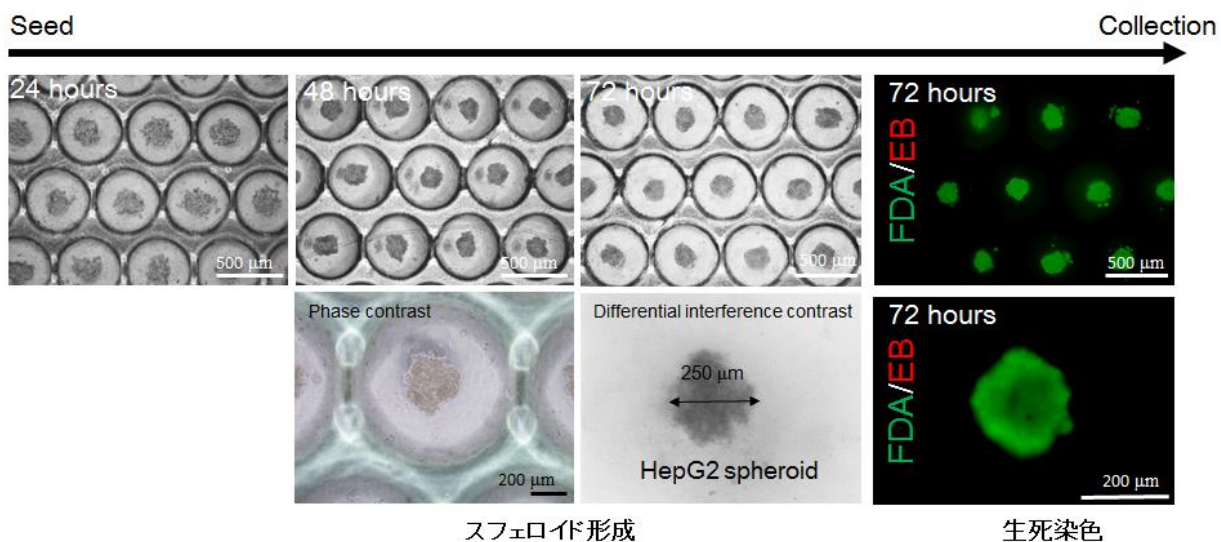


Figure 4.6 PDMS プレートを用いたスフェロイドの作製と生死染色結果

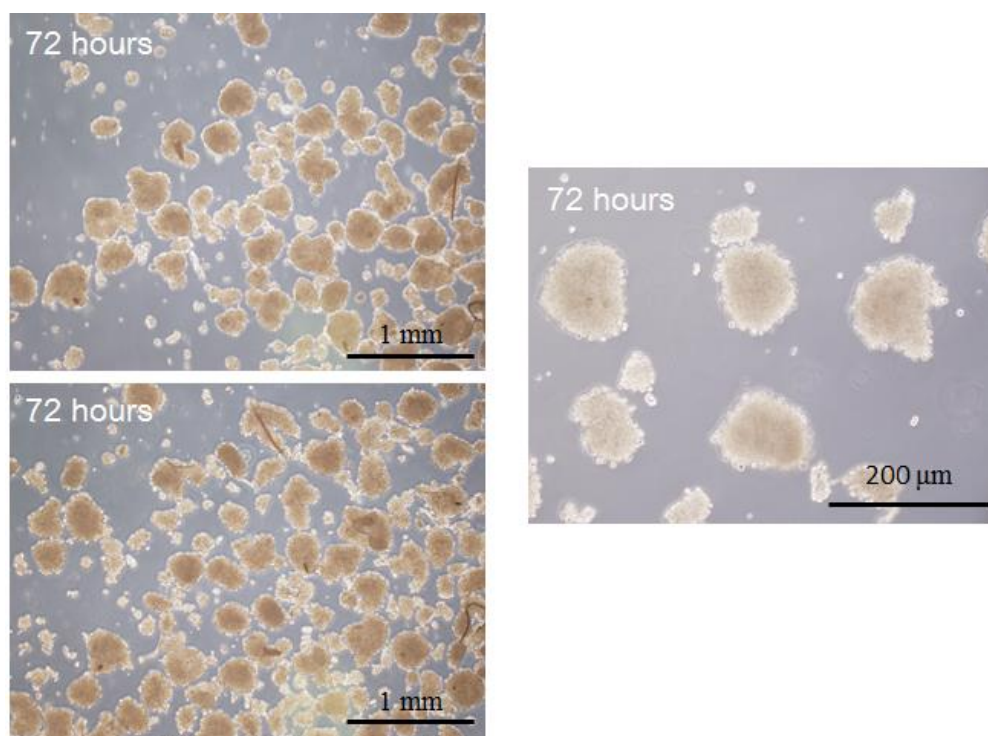


Figure 4.7 PDMS プレートを用いたスフェロイドの回収（培養から 72 時間後）

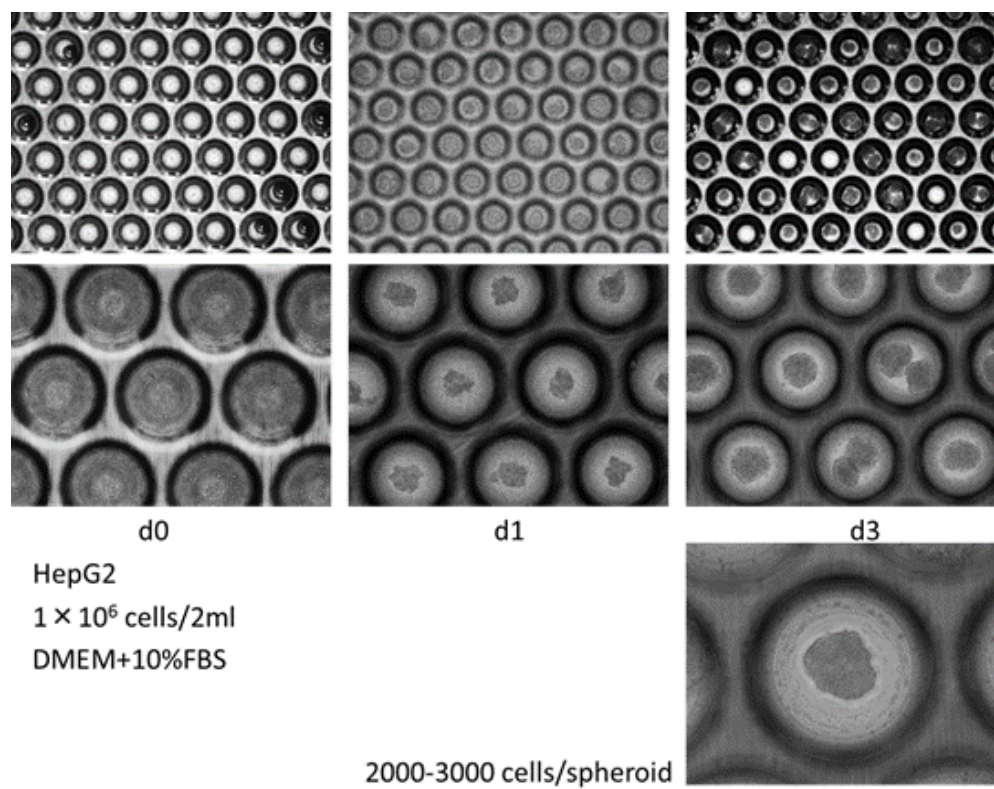


Figure 4.8 Elplasia を用いたスフェロイドの形成

4.3 ヒト肝癌細胞、ヒト初代肝細胞を用いた肝臓類似組織の形成

4.3.1 はじめに

前節では、肝細胞を用いたスフェロイドの作製手法を検討し最適化を行った。今節では、作製したスフェロイドを前節で紹介した送液可能な血管構造と自己組織的な血管構造が組み合わされた組織内に導入し、肝臓組織作製を行った。その後、送液培養を行い、血管ネットワークの形成の観察と回収した培地からアルブミンの濃度とアンモニア代謝量を測定した。肝臓細胞は、ヒト肝癌細胞である HepG2 とヒト初代肝細胞を用いた。

4.3.2 肝臓の発生過程を模倣した肝臓組織構築

前章では、微小血管構造の形成に血管内皮細胞と間葉系幹細胞の共培養を行った。その結果血管内皮細胞の内皮ネットワークは間葉系幹細胞がない場合と比べるとより発達したネットワークを形成し、長期間その構造が維持されることが分かった。これは主に間葉系幹細胞が分泌する成長因子、その多くは血管内皮細胞増殖因子が関与していることが分かっている。このように、共培養系においては各細胞の働きだけではなくその相互作用も理解する必要がある。一方で、本実験系、つまり血管内皮細胞と間葉系幹細胞、そして肝臓細胞の 3 つの細胞の共培養系においては、また別の働きによって細胞間相互作用があることが知られている。Fig. 4.9 にヒトの肝臓の発生における細胞の役割の模式図を示す。まずシート上になった肝前駆細胞に血管内皮細胞が接着しその周囲に間葉系幹細胞が配置されて

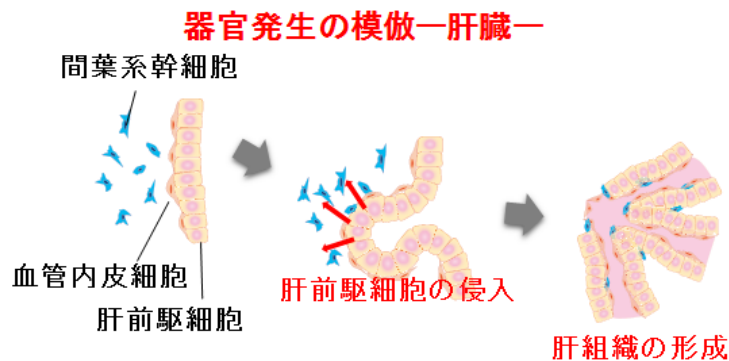


Figure 4.9 肝臓の発生過程と 3 細胞の細胞間相互作用の重要性

いるところから肝臓の発生は始まる。この段階から徐々に肝前駆細胞が間葉系幹細胞の方へ侵入し埋没する。この時間葉系幹細胞はこの埋没を引きこむような分化因子を放出する。その後、この構造を基に血管内皮細胞が埋没部分の内表面を覆うことによって肝臓の類洞構造を形成する。この現象が連続的に起こることで肝臓の肝小葉構造が形成される。このように、肝臓の発生過程において、血管内皮細胞、間葉系幹細胞、肝前駆細胞は細胞間相互作用により、重要な役割を果たす。この時、間葉系幹細胞は肝前駆細胞の分化と、血管形成の両方に関わることとなる。この原理を利用して横浜市立大学の武部らは、この三種類の細胞をマトリゲル上で培養し凝集を利用することによって、ミニ肝臓なる組織体を作製している[4]。これは、細胞だけからなる組織体であるこれをマウスに移植することにより、

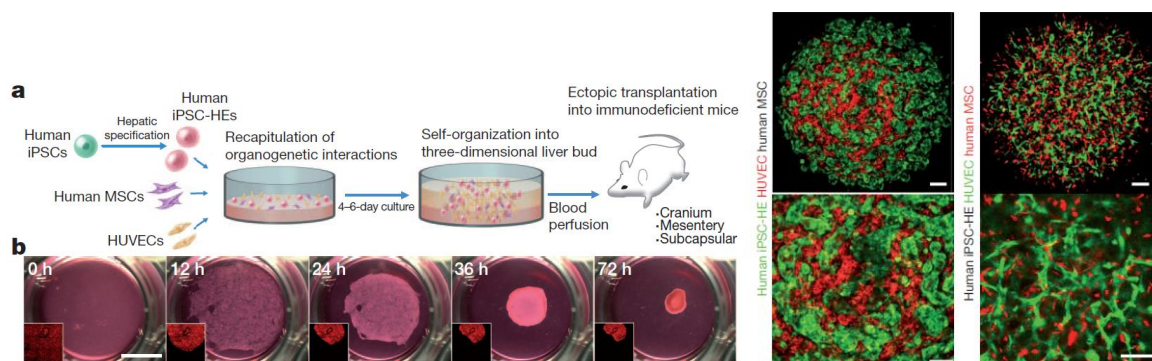


Figure 4.10 肝臓発生を利用したミニ肝臓の作製

T. Takebe, *Nature* 499, 481–484 (25 July 2013)

その治療効果を証明した。しかし、これは、細胞の自己組織的な能力のみに頼った方法であるため、移植した後に、血管構造と生体の血管構造が接続するのには 3 日程度の時間がかかることが依然として問題であった。本研究では更に、この自己組織的な能力に加えて電気化学的な血管構造作製手法と組み合わせることにより、独自の肝臓組織作製を行う。

4.3.3 本節の目的

本節では、肝がん細胞もしくはヒト初代肝細胞の二種類の細胞を用いてスフェロイドを作製し、それを電気化学的な手法で作製した血管構造間に組み込むことによって肝臓類似組織体を作製する。

4.3.4 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
 - ・RFP-MSC, from Lonza.
 - ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
 - ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
 - ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
 - ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
 - ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
 - ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)
- スミロン Prime surface 96well(住友ベークライト)
- ・Pluronic F-127 (SigmaAldrich)

- ・ ヒト肝がん細胞 HepG2 (Hepatic carcinoma cells)
- ・ DMEM high glucose (Sigma)
- ・ Fetal Bovine Serum (Gibco)
- ・ PDMS・ウシ血清アルブミン：BSA, (Sigma)
- ・ GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・ アンモニアテストワコー(Wako)
- ・ ELISA anti-human albumin antibody(Abcam) 1:500

【実験手順】

[RGD ペプチド修飾金線の作製]

ガラスキャピラリー洗浄

30~50 本のガラスキャピラリーを PDMS で作製した土台に垂直に差し込み、純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

ガラスキャピラリーの Au/Cr 層のスパッタ

PDMS の土台にガラスキャピラリーを差し込んだ状態で、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分 30 秒間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 3 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

50 μ M RGD ペプチド溶液にガラスキャピラリーもしくはマルチニードルを一晩 (12~15h) 浸漬させた後、純水で洗浄した。

[金線培養]

金線の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金線をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

金線を非接着性ディッシュに 5~10 本もしくはマルチニードルを 1 本入れ、EBM-2 に 7.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁した HUVEC を 1 ディッシュ当たり 2 mL 量、つまり 1.5×10^5 cells/dish の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベーター内で 37℃、5% CO₂-Air のもとで、金線周囲を完全に覆うまで、3~4

日間培養した。

[血管様構造の作製]

培養チャンバーの作製

厚さ 2 mm のアクリル板をレーザー加工機で指定の形状に切断し、接着剤（アクリサンダー）を用いて、培養チャンバーを作製した、細胞に害を与えないように、80℃オーブンに数十分入れて、接着剤を完全に乾燥させた。更に、純水に一晩漬けた後、70%エタノールで滅菌して使用した。

金線の固定

培養した金線を PBS 溶液に一度漬けてから、表面の細胞を乾燥させないように、アクリルの培養チャンバーに 3 本固定した。このとき、細胞を傷つけないように注意しながら差し込んだ。

GelMa 溶液への細胞懸濁

血管内皮細胞を 2.0×10^6 cells/ml と間葉系幹細胞を 1.0×10^5 cells/ml を GelMa に懸濁させる。更に、kuraray の Elplasia で作製した肝臓スフェロイドを 300 個/ml の濃度で懸濁させた。1 つのスフェロイドが 2000-3000 個の細胞からなることから、 $6.0-9.0 \times 10^5$ cells/ml の細胞密度で細胞を充填したこととなる。またコントロールとして同細胞数をスフェロイドにすることなくシングル細胞のまま包埋した系も用意した。

GelMa 溶液のゲル化

GelMa 溶液をチャンバー内に 0.5ml-1ml を流し入れ UV 光を $5.0\text{mW}/\text{cm}^2$ の出力で 60 秒×2 当ててゲル化させた。

電位の印加

金線を作用極、銀/塩化銀線を参照極、白金板を対極として、GelMa 内に差し込むことで三電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 V を 5 分間印加した。

血管様構造の形成

電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、チャンバーから金線を 3 本とも丁寧に真っ直ぐ引き抜くことで、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

血管構造の送液培養と観察

培地をシリンジポンプで送液しながら培養し、経時的に血管構造を位相差顕微鏡で観察した。アンモニア代謝量を測定するために、培地には予め 1mM の塩化アンモニウム(NH_4^+Cl)を加えておく。

培地の回収

送液培養後のリザーバーに溜まった培地を毎日回収する。

アンモニア代謝量の測定とアルブミン量の測定

回収した培地からアンモニア量とアルブミン量を定量した。アンモニアはアンモニアテストワコーを用い、アルブミンは ELISA を用いて測定を行った。ELISA のプロトコルは一般的な ELISA 手法に従った。

4.3.5 実験結果と考察

Fig. 4.11 に培養から 5 日目までの蛍光顕微鏡の写真を示す。血管内皮細胞(HUVEC)は緑色蛍光で間葉系幹細胞は赤色の蛍光でラベルされている。また、染色はされていないがゲルには HepG2 もしくは HepG2 のスフェロイドを包埋した。経時的な観察の結果、HUVEC はゲル中で内皮細胞ネットワークを形成していた。この時 MSC も増殖している様子が確認できた。位相差顕微鏡の観察から HepG2 は同様に増殖しコロニーを形成していることが分かる(**Fig. 4.12**)。一方で作製した血管構造は培養を続けても変化はなく、ゲル中に伸長することはなかった。アルブミンの濃度の経時的な測定結果を **Fig. 4.13** に示す。また、ゲルに HUVEC と MSC を加え共培養をしたほうが HepG2 を単独で加えた場合に比べて大きな違いが見られた。その分泌量は培養 7 日後には、2 倍の差となった。このことから、血管内皮細胞と間葉系幹細胞とを共培養することによって HepG2 にとってはアルブミンの合成能が上昇し、HUVEC の血管ネットワーク形成能も上昇するという 2 つの効果が得られた。これはこれらの細胞間相互作用が関連していると思われる。また、スフェロイドではなく HepG2 をシングルセルで包埋し培養した場合は、スフェロイドで培養した時よりもアルブミンの分泌量は減少した。このことから、シングルセルで細胞を包埋した場合より、スフェロイドで培養したほうがアルブミンの代謝量が上昇し、肝臓組織として成熟したものが作製できたと考えられる。

Fig. 4.15 に初代肝細胞をゲルに包埋した際の結果を示す。初代肝細胞と MSC と HUVEC をゲルに懸濁し培養した結果 HepG2 を加えた時のように、HUVEC はゲル中でネットワークを形成し MSC は増殖していった。一方で HepG2 の場合と比べて全体的に HUVEC のネットワークが少ないようにみえる。共焦点顕微鏡による観察では HUVEC の管腔構造は筒構造を形成しているようにみえる(**Fig. 4.15**)。位相差顕微鏡の画像を見ると初代肝細胞も小さな凝集体を形成していた。しかし初代肝細胞は HepG2 のように増殖しないために凝集体の大きさは小さく、数個の細胞が集まったような形となっていた。この時のアルブミン濃度を測定した結果が **Fig. 4.16** である。初代肝細胞を加えた場合には、HepG2 の共培養時に比べて合成能は低く、HepG2 の単独培養寄りという結果となった。これは HepG2 と初代肝細胞の増殖率の違いが起因しているのではないかと考えられる。ゲル中での細胞数を正確に知ることができないために、1 細胞あたりのアルブミンの合成能を測定することは難しい。この時のアンモニア代謝の結果を **Fig. 4.17** に示す。これより、送液培養するに連れてアンモニアの代謝量は上昇した。この

ことより、ヒト初代肝細胞を用いて作製した肝臓類似組織はアルブミン分泌と薬物代謝の 1 つであるアンモニア代謝を行う組織体であることを証明した。

4.3.6 本節のまとめ

本節では、初代肝細胞とヒト肝がん細胞を血管構造を備えた組織体に組み込み、肝臓類似組織を作製した。その結果、アルブミン分泌能の上昇とアンモニア代謝の上昇を確認した。更に、スフェロイドを組み込んだほうがアルブミン量は上昇し、HUVEC と MSC との共培養をした場合の方がアルブミンの量が高かった。この手法により、ヒト初代肝細胞を用いて作製した肝臓類似組織はアルブミン分泌と薬物代謝の 1 つであるアンモニア代謝を行う組織体であることを証明した。

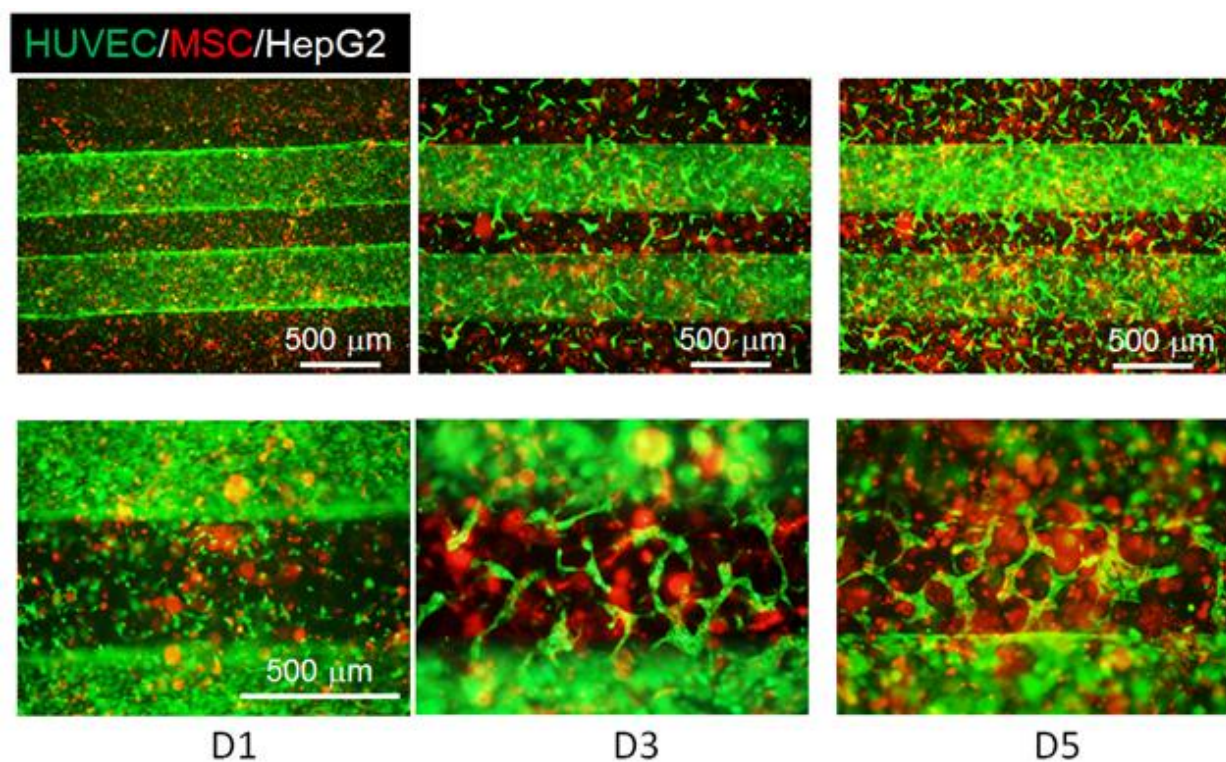


Figure 4.11 HUVEC, MSC, HepG2 の共培養と血管構造

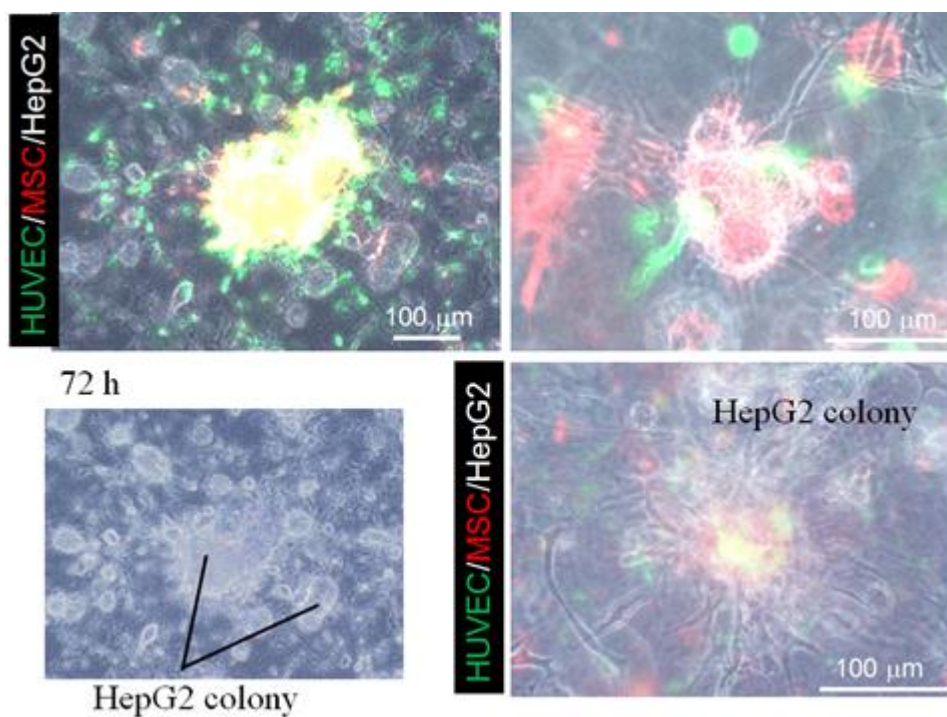


Figure 4.12 位相差画像 HUVEC, MSC, HepG2 の共培養と血管構造

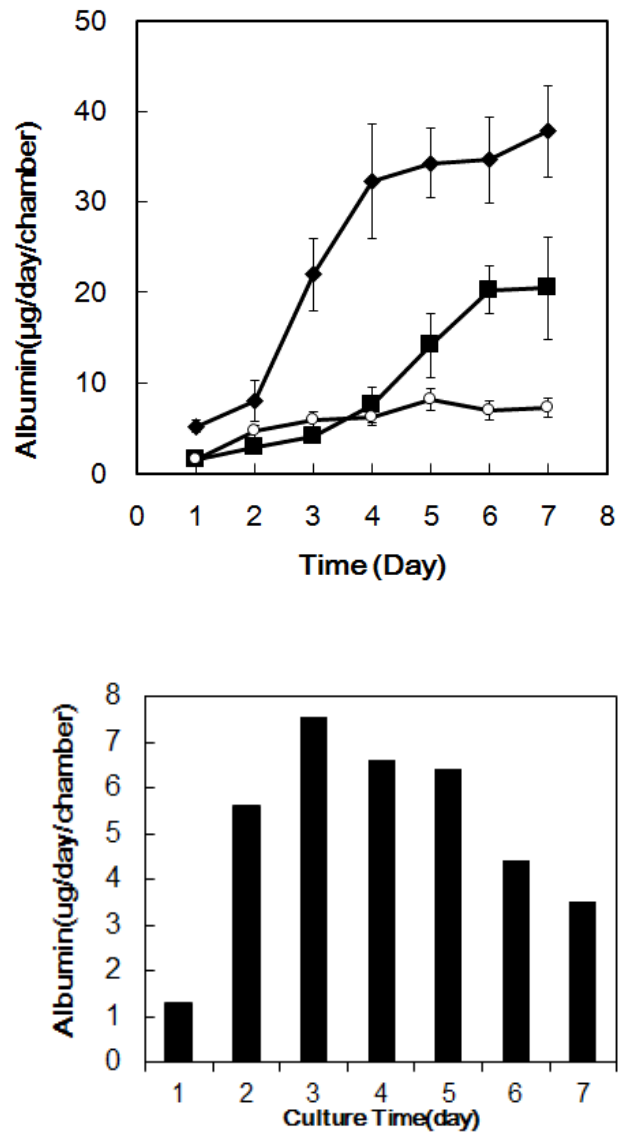


Figure 4.13 回収した培地のアルブミン濃度変化

- (上) ◆HUVEC+MSC+HepG2 スフェロイド包埋、■HepG2 スフェロイド包埋のみ、
 (培地 $24 \times 60 \times 10 \mu\text{L} = 14.4 \text{ ml}$)
 ○HepG2 シングルセル包埋コントロール
 (下) HepG2 のアルブミン分泌量、単層培養

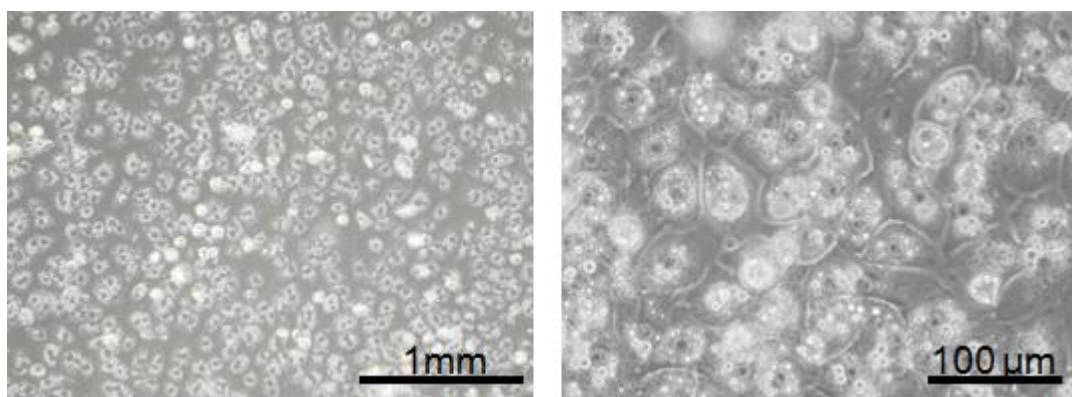


Figure 4.14 初代肝細胞の単層培養の位相差顕微鏡写真

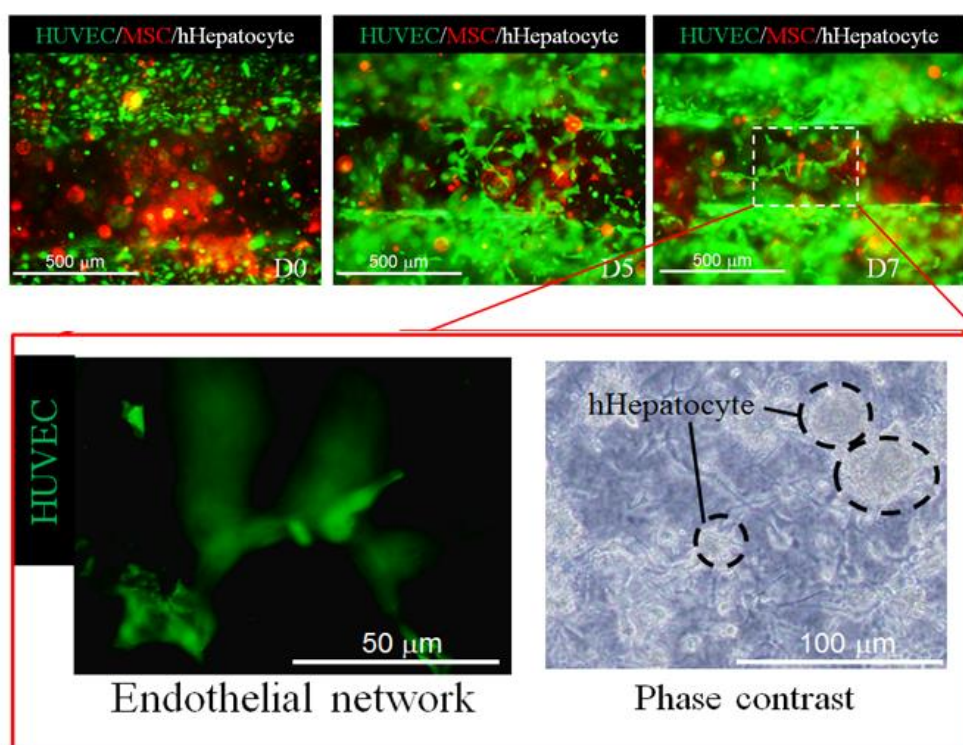


Figure 4.15 HUVEC, MSC, ヒト初代肝細胞の共培養と血管ネットワーク構造と初代肝細胞のスフェロイド

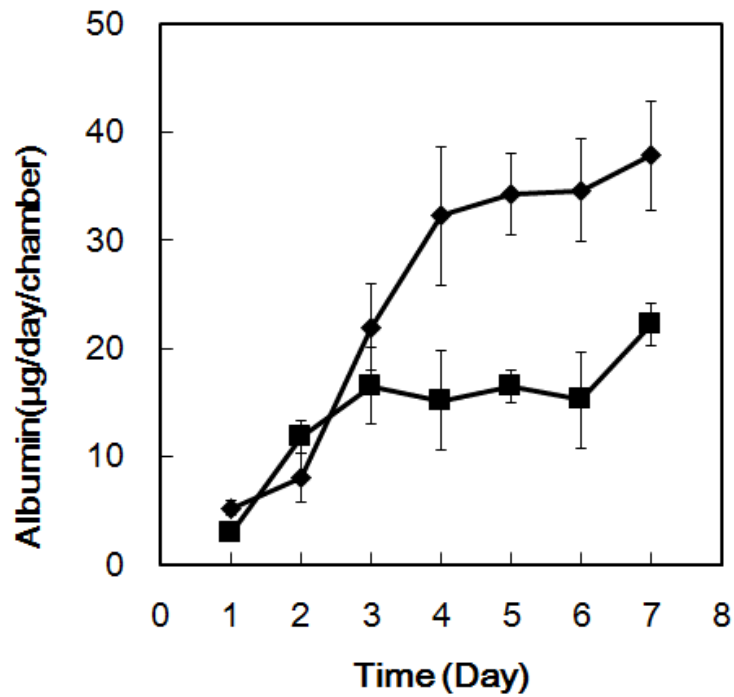


Figure 4.16 回収した培地のアルブミン濃度変化

◆HUVEC+MSC+HepG2 スフェロイド包埋、■HUVEC+MSC+初代肝細胞スフェロイド包埋

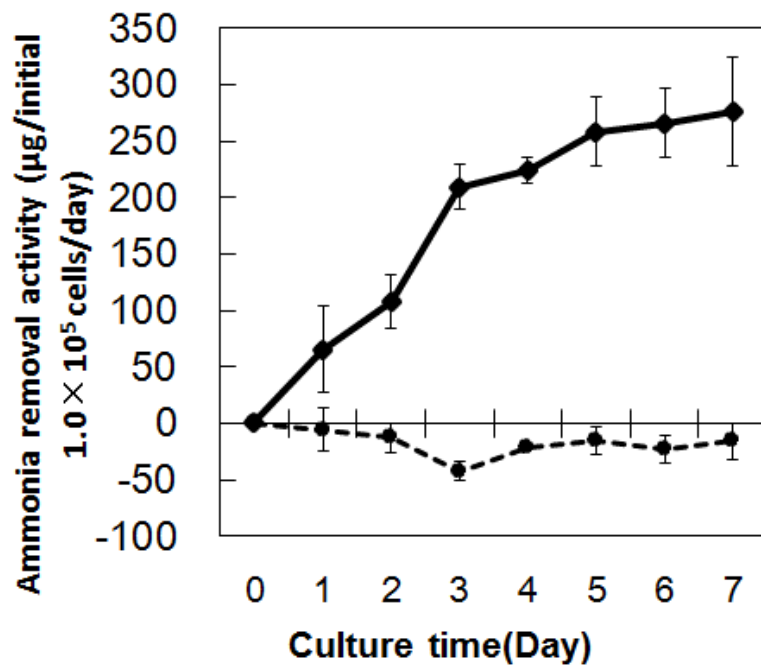


Figure 4.17 回収した培地のアンモニア量から算出したアンモニア代謝速度

((上) ◆HUVEC+MSC+HepG2 スフェロイド包埋、●HUVEC+MSC+初代肝細胞スフェロイド包埋

4.4 ヒト iPS 細胞を用いた 3D 肝臓類似組織の形成

4.4.1 はじめに

前節では、ヒト初代肝細胞もしくはヒト肝がん細胞を用いて肝臓類似組織を構築した。これらの組織を移植し、再生医療として治療に用いるためには、実際に治療に使われる形態を考慮する必要がある。肝がん細胞は、がん細胞である、無限に増殖する能力を持っているためもちろん臨床応用などの移植には使用できない。その点、ヒト初代肝細胞は拒絶反応の心配はあるが、移植してもがん化することではなく、代謝機能は非常に高いため治療に用いることも可能である。しかし、3次元組織作製には大量の実質細胞、本研究では肝細胞が必要となるが、ヒトから採取できる肝細胞は非常に少なく治療に用いるほど多くの肝細胞を確保することができない。また、ヒト初代細胞の培養は非常に難しく、長期間その活性を保ったまま維持培養できる手法は確立されていない。そこで本研究では、近年研究され始めている iPS 細胞に着目し、iPS 細胞から肝細胞へと分化させた肝細胞、更には肝スフェロイドと前章で用いた血管構造作製手法を用いて、iPS 細胞から誘導した血管構造を持つ肝臓類似組織の作製に取り組んだ。臨床応用において、患者自身の細胞から作製した、iPS 細胞を用いれば、拒絶反応の心配はなく、iPS 細胞の無限増殖能から大量の肝細胞を確保できる。

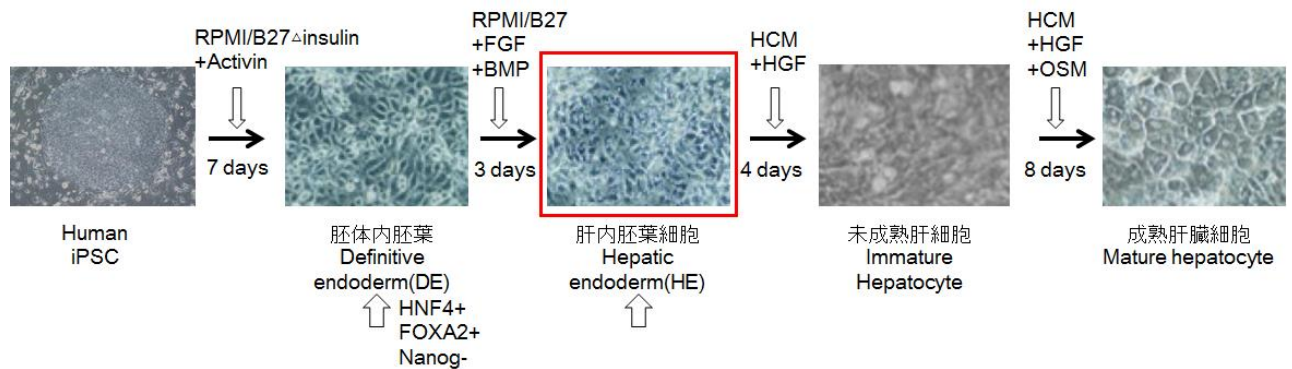


Figure 4.18 本研究で用いる iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコル

4.4.2 iPS 細胞から成熟肝細胞への分化

iPS 細胞から成熟肝細胞への分化の手順は様々な研究者が研究しており、分化効率や取得細胞数、スピードを向上させる様々なプロトコルが存在する[5-7]。これらの研究は主に、どのようにして未分化状態を維持するか、もしくはどれだけ素早くかつ効率よく iPS 細胞から肝細胞もしくは肝前駆細胞二分化させるのかといった研究である。本研究では D'Amour KA らが提唱した iPS 細胞から肝細胞への分化プロトコルを採用し[8]、それを最適化した分化プロトコル[4, 9]を実際に使用した。この肝細胞分化プロトコルを **Fig. 4.18** に示す。iPS 細胞から成熟肝細胞への分化では、その分化段階において 4 種類の細胞腫に分けられている。RPMI+Activin が含まれた培地で iPS 細胞を培養すると培養から一週間ほどで胚体内胚葉細胞(Definitive endoderm(iPS-DE))へと分化する。この細胞は、肝臓発生においても最初の段階の細胞であり、内胚葉系もしくは中胚葉系への運命決定がされた細胞である。その

後線維芽細胞増殖因子(FGF)と骨形成タンパク質(BMP)存在下で培養すると、肝内胚葉細胞(Hepatic endoderm(iPS-HE))へと分化する。この細胞は内胚葉への運命決定がなされ更に、肝臓細胞へ分化しやすくなった細胞である。いわば、肝前駆細胞と言える段階である。その後、Hepatic culture medium(HCM)と肝細胞増殖因子(HGF)で培養すると、4日ほどで未成熟肝細胞となり、Oncostatin M(OSM)を加える事で最終的に成熟肝細胞へと分化する。この分化の間、肝臓としての機能は徐々に上昇していく。本研究では、この分化を判断するための指標としてアルブミン分泌量もしくは mRNA から幾つかの分化マーカーを定量的に解析し、分化度合いの指標とした。肝臓としての機能は上昇していく一方で、増殖速度は徐々に低下していく、分化を始めた初期の iPS-DE では増殖速度は早い、iPS-HE になる頃から増殖速度は減少していき、成熟肝細胞ではほとんど増えなくなる。これは、増殖能と引き換えに分化が進み細胞の機能獲得が起こる現象であり、ヒト初代肝細胞も同様に生体外のディッシュ上では増殖することはない。それに加え、成熟肝細胞に近づくにつれて、細胞は敏感になっていき、ディッシュ上からの細胞回収操作で死んでしまう細胞が多くなる。例えば、十分に分化させた成熟肝細胞はディッシュからトリプシンやアキュターゼによって回収すると 70-80%の細胞が再接着せずに死んでしまう。そのため、本研究においてはどの段階の細胞を、これまで確立してきた血管構造を備えた組織へと組み込むかが重要となってくる。細胞の機能と細胞の機能を考慮すると、iPS-DE の細胞もしくは iPS-HE 細胞をスフェロイド上にして培養し 3D 肝組織を作製するのが良いように思われる、そこで本研究ではまず、どちらの段階の細胞をどのような形で送液培養系に組み込み 3 次元組織を作製すればよいかを検討した。また、iPS 細胞からどのような分化効率で肝細胞へ分化するか、もしくは分化した肝細胞がどの程度の機能を持つかはホストの性質に依存するということが分かっている[10]。つまり、肝細胞へ分化しやすい iPS 細胞しにくい iPS 細胞があるということである (Figure4.19)。

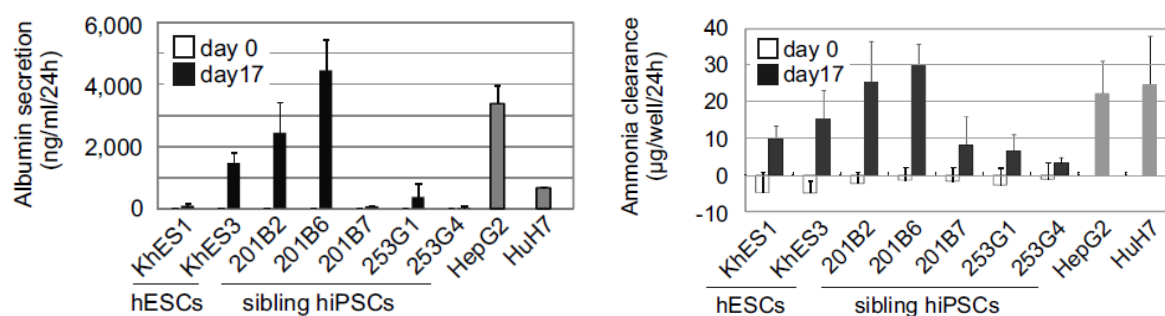


Figure 4.19 iPS 細胞のホストによるアルブミン分泌量とアンモニア代謝速度の違い[10]

本研究では比較的肝細胞へと分化しやすく機能も高いとして知られている TkDA、iPS 細胞株を用いることにした。

4.4.3 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)
- ・

【試薬】

- ・iPS 細胞(TkDA) from takebe (Yokohama city university)
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)
- ・セルカルチャーインサート(BD Falocon) 6 well type 0.1 μm, 8 μm
- ・ActivinA (R&D Systems)
- ・Wnt3a (R&D Systems)
- ・RPMI 1640(Sigma) containing 1×B27supplement (Invitrogen)
- ・knockout-DMEM (KO-DMEM) (Invitrogen)
- ・20% (vol/vol) knockout serum replacement (KSR) (Invitrogen)
- ・1 mM L-glutamine (Invitrogen)
- ・1% (vol/vol) nonessential amino acids (Invitrogen)
- ・0.1 mM 2-mercaptoethanol (Invitrogen)
- ・1% (vol/vol) DMSO (Sigma)

抗体名	反 応 性	免 疫 種	型番	メーカ一	Applicatio n	保管場所	希釈濃度*1
HNF4a (C11F12) Rabbit mAb	Hum an	Rab bit	3113 S	Cell Signaling	WB, IHC, IF-IC	-20℃	1/200
Human Albumin cross- adsorbed Antibody	Hum an	Goat	A80- 229 A	Bethyl	WB, IHC, ICC, ELISA	4℃	1/100

Table 4.1 染色に使用した抗体

抗体名	反 応 性	免疫種	型番	メーカー	保 管 場所	希 釈 濃 度 *1
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit igG (H+L)	Rabbit	goat	A21428	Life Technologies	4°C	1/200
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit igG (H+L)	Rabbit	goat	A11008	Life Technologies	4°C	1/200
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit igG (H+L)	Goat	Donkey	A21432	Life Technologies	4°C	1/200

Table 4.2 染色に用いた 2 次抗体

Target gene	Forward primer sequence(5'-3')	Reverse primer sequence(5'-3')
GAPDH	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
b-actin	CAT CGA GCA CGG CAT CGT CA	TAG CAC AGC CTG GAT AGC AAC
Oct 3/4	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC
Nanog	CCT GTG ATT TGT GGG CCT G	GAC AGT CTC CGT GTG AGG CAT
SOX17	CGC TTT CAT GGT GTG GGC TAA GGA CG	TAG TTG GGG TGG TCC TGC ATG TGC TG
CXCR4	GGT GGT CTA TGT TGG CGT CT	ACT GAC GTT GGC AAA GAT GA
HNF4A	CCA CGG GCA AAC ACT ACG G	GGC AGG CTG CTG TCC TCA T
FOXA2	TGG GAG CGG TGA AGA TGG AAG GGC AC	TCA TGC CAG CGC CCA CGT ACG ACG AC
AFP	AAA TGC GTT TCT CGT TGC TT	GCC ACA GGC CAA TAG TTT GT
ALBUMIN	CTT CCT GGG CAT GTT TTT GT	TGG CAT AGC ATT CAT GAG GA
CYP3A7	CAA AAG ACT CTG AGA CCC ACA A	AGC CAG CAA AAA TAA AGA TAA TTG A
RBP4	GCC TCT TTC TGC AGG ACA AC	CGG GAA AAC ACG AAG GAG TA
TTR	ATG GCT TCT CAT CGT CTG CT	GCT CCT CAT TCC TTG GGA TT
AAT	CTT TGA AGT CAA GGA CAC CG	GCT GAA GAC CTT AGT GAT GC
PEPCK	TGC ATG AAA GGT CGC ACC A	CAC AGA ATG GAG GCA TTT GAC A
G6PC	GCT TGG ATT CTA CCT GCT AC	AAA GAC TTC TTG TGT GTC TGT C

Table 4.3 Real-time RT-PCR に用いたプライマー

【実験手順-iPS 細胞から肝細胞への分化】

iPS 細胞の維持培養と回収

TkDA-iPS 細胞は SNL フィーダー細胞もしくはマトリゲル上で未分化維持培養を行った。継代時には CTK 液によりフィーダー細胞を脱離させ純化を行った。未分化維持の確認には、未分化マーカーの 1 つである OCT3/4 を用いこれを免疫染色することにより確認した(Fig. 4.20-21)。

iPS 細胞から、胚体内胚葉細胞 iPS-DE 細胞への分化

培地を RPMI1640+B27△insulin、培地に交換し、一週間程度分化誘導培養を行った。この時培地には更に ActivinA を 100 ng/ml の濃度で加えた(Fig. 4.22)。

胚体内胚葉細胞 iPS-DE 細胞から肝内胚葉細胞 iPS-HE 細胞、への分化

培地を RPMI1640+B27 培地に交換し、3-4 日程度分化誘導培養を行った。この時、培地には更に bFGF を 10 ng/ml、BMP4 を 20 ng/ml の濃度で加えた。これらの細胞の分化の確認は HNF4a と FOXA2 と Nanog の発現を PCR で調べることで行った。

【実験手順-iPS-DE もしくは iPS-HE 細胞を用いたスフェロイドの作製】

作製手順は前節の作成手順と同様の方法を用いた。

【iPS-HE フェロイドを用いた 3 次元肝臓類似組織の作製】

[RGD ペプチド修飾金線の作製]

ガラスキャピラリー洗浄

30~50 本のガラスキャピラリーを PDMS で作製した土台に垂直に差し込み、純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4 の沸騰水溶液に 5 分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを 2 回それぞれ 5 分間行い、自然乾燥させた。

ガラスキャピラリーの Au/Cr 層のスパッタ

PDMS の土台にガラスキャピラリーを差し込んだ状態で、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力 100 W、アルゴン雰囲気下 0.3 Pa にて Cr を 1 分 30 秒間スパッタした。Cr は Au 層の密着層である。引き続き、Au を同条件にて 3 分間スパッタした。

RGD ペプチドの修飾

50μM RGD ペプチド溶液にガラスキャピラリーもしくはマルチニードルを一晩 (12~15h) 浸漬させた後、純水で洗浄した。

[金線培養]

金線の滅菌

RGD ペプチドを修飾した金線をクリーンベンチ内で 70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ 5 分間浸漬し、滅菌した。

細胞の播種

金線を非接着性ディッシュに 5~10 本もしくはマルチニードルを 1 本入れ、EBM-2 に 7.5×10^4 cells/mL の密度で懸濁した HUVEC を 1 ディッシュ当たり 2 mL 量、つまり 1.5×10^5 cells/dish の密度で播種した。

細胞の培養

播種した細胞をインキュベーター内で 37℃、5% CO₂-Air のもとで、金線周囲を完全に覆うまで、3~4 日間培養した。

[血管様構造の作製]

培養チャンバーの作製

厚さ 2 mm のアクリル板をレーザー加工機で指定の形状に切断し、接着剤（アクリサンダー）を用いて、培養チャンバーを作製した、細胞に害を与えないように、80℃オーブンに数十分入れて、接着剤を完全に乾燥させた。更に、純水に一晩漬けた後、70%エタノールで滅菌して使用した。

金線の固定

培養した金線を PBS 溶液に一度漬けてから、表面の細胞を乾燥させないように、アクリルの培養チャンバーに 3 本固定した。このとき、細胞を傷つけないように注意しながら差し込んだ。

GelMa 溶液への細胞懸濁

血管内皮細胞を 2.0×10^6 cells/ml と間葉系幹細胞を 1.0×10^5 cells/ml を GelMa に懸濁させる。更に、kuraray の Elplasia で作製した肝臓スフェロイドを 300 個/ml の濃度で懸濁させた。1 つのスフェロイドが 2000-3000 個の細胞からなることから、 $6.0-9.0 \times 10^5$ cells/ml の細胞密度で細胞を充填したこととなる。またコントロールとして同細胞数をスフェロイドにすることなくシングル細胞のまま包埋した系も用意した。

GelMa 溶液のゲル化

GelMa 溶液をチャンバー内に 0.5ml-1ml を流し入れ UV 光を $5.0\text{mW}/\text{cm}^2$ の出力で 60 秒×2 当ててゲル化させた。

電位の印加

金線を作用極、銀/塩化銀線を参照極、白金板を対極として、GelMa 内に差し込むことで三電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 V を 5 分間印加した。

血管様構造の形成

電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、チャンバーから金線を 3 本とも丁寧に真っ直ぐ引き抜くことで、GelMa 内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。

血管構造の送液培養と観察

培地をシリンジポンプで送液しながら培養し、経時的に血管構造を位相差顕微鏡で観察した。アンモニア代謝量を測定するために、培地には予め 1mM の塩化アンモニウム(NH_4^+Cl)を加えておく。なお送液した培地は HGF を含まない EGM-2 である。

培地の回収

送液培養後のリザーバーに溜まった培地を毎日回収する。

アンモニア代謝量の測定とアルブミン量の測定

回収した培地からアンモニア量とアルブミン量を定量した。アンモニアはアンモニアテストワコーを用い、アルブミンは ELISA を用いて測定を行った。ELISA のプロトコルは一般的な ELISA 手法に従った。

送液培養後の組織回収と Total RNA の抽出

送液培養を行った組織体は遺伝子発現量解析を行うために、RNeasy mini kit を用いて組織体の total RNA を抽出した。以下のその手順を示す。

Real time RT-PCR による遺伝子発現量解析

上記で抽出した RNA を用いて RT-PCR を行った。解析した遺伝子と使用したプライマーの配列を Table 4.3 に示す。

Rneasy mini kit

Methods:

1. 細胞数を数える。培養液を吸引除去し、PBS で細胞を洗浄する。PBS を吸引除去し、0.1 ~0.25% トリプシンを含む PBS を加える。ディッシュあるいはフラスコから細胞を剥離後、培養液（トリプシンを不活性化するために血清を含む）を添加し、細胞を RNase フリーのガラスあるいはポリプロピレン

製遠心チューブ（別途準備）に移し、300 x g で 5 分間遠心する。

2. Buffer RLT を添加して細胞を破碎する。

2 ペレット化した細胞は指で軽く叩きルーズにする。適切な量の Buffer RLT を添加する（表 5 参照）。ボルテックスあるいはピペットで混和して、ステップ 3 に進む。

3. 細胞ライセートをステップ 3a、3b あるいは 3c に従ってホモジナイズする。

2 ml のコレクションチューブにセットした QIAshredder スピンカラムにライセートを直接ピペットで添加し、最高スピードで 2 分間遠心操作する

4. ホモジナイズされたライセートに同量の 70%エタノール（RNAfree 水で希釈）を添加し、ピペティングによりよく混和する。遠心操作は行なわない。

5. 最高 700 μ l のサンプル（形成した沈殿物を含む）を、2 ml コレクションチューブ（添付）中にセットした RNeasy スピンカラムにアプライする。蓋を静かに閉めて、8000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心操作する。ろ液を捨てる。

6. 700 μ l の Buffer RW1 を RNeasy スピンカラムに添加する。蓋を静かに閉め、スピンカラム・メンブレンを洗浄するために 8000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心操作する。ろ液を捨てる*。

7. RNeasy スピンカラムに 500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉め、スピンカラム・メンブレン洗浄のために 8000 x g（10,000 rpm）以上で 15 秒間遠心する。ろ液を捨てる。

8. RNeasy スピンカラムに 500 μ l の Buffer RPE を添加する。蓋を静かに閉め、RNeasy スピンカラム・メンブレンを乾燥するため、8000 x g（10,000 rpm）以上で 2 分間遠心操作する。

9. RNeasy スピンカラムを新しい 2 ml コレクションチューブ（添付）に移し、ろ液の入った古いコレクションチューブを捨てる。蓋を静かに閉めて、最高スピードで 1 分間遠心操作を行なう。

10. RNeasy スピンカラムを新しい 1.5 ml コレクションチューブ（添付）にセットする。RNase フリー水 30~50 μ l を直接スピンカラム・メンブレンに添加する。蓋を静かに閉め、8000 x g（10,000 rpm）以上で 1 分間遠心操作を行ない、RNA を溶出する。

4.4.4 実験結果と考察

フィーダー細胞上の iPS の画像を **Fig. 4.20** に示す。iPS 細胞はフィーダー細胞上でコロニーの形態を保ちつつ増殖していく。一般的にこのコロニー内の細胞が詰まったような形の方が、未分化維持ができていると言われているが、本研究で培養した iPS 細胞もそのような形態を示していた。iPS 細胞を回収するには先に CTK 液によってフィーダー細胞だけを表面から取り除き、その後セルスクレーパーで回収することで iPS 細胞を継代できる。OCT3/4 は iPS 細胞作製の際の初期化因子としても知られているが、発生における幹細胞マーカーとしても知られている。iPS 細胞の未分化維持を確認するために、OCT3/4 を染色した結果を **Fig. 4.20** に示す。染色結果から OCT3/4 が iPS 細胞のみに発現していることが分かる。このことから、培養した iPS 細胞は未分化を維持したまま培養できていることがわかった。次に、実際に用いる前に、Matrigel 上で培養し、細胞の純化と選別を行った。Matrigel 上の培養でも OCT3/4 が発現していることを確認した。iPS-DE の位相差顕微鏡、及び蛍光顕微鏡の写真を **Fig. 4.22** に示す。iPS 細胞では細胞は非常に密な形態を示し、細胞核がクニンできない状態であったが、iPS-DE まで分化誘導を行うと、細胞の形態はくっきりとして一つ一つの細胞が認識できるようになる。TkDa 細胞は予め、GFP が導入されているために蛍光顕微鏡で観察可能である。iPS-HE の位相差顕微鏡、及び蛍光顕微鏡の写真を **Fig. 4.23** に示す。ここまで分化誘導をかけると細胞の継代は肝細胞に特徴的な敷石状の細胞形態を示す。さらに、このまま培地を肝細胞増殖培地に変えて培養すると成熟肝細胞へと分化できる。この分化段階から、肝細胞としての機能が発現され、遺伝子マーカーやアルブミン分泌から判断できるようになる。iPS-DE 及び iPS-HE スフェロイドをハイドロゲルで包埋し、アルブミン分泌量を比較した結果を **Fig. 4.24** に示す。スフェロイド包埋から 5 日ほどでアルブミン分泌量が測定範囲に入ってきたのに対し、iPS-DE は 8 日ほどでアルブミン分泌量が確認された。一方で、iPS-HE は 200 ng/day の分泌速度まで上がったのに対して、iPS-DE では 30 ng/day ほどの分泌量にとどまった。このことから、早い段階でスフェロイドにしてハイドロゲルに包埋したとしても、最終的に分泌量が大きく上がることなく死んでしまうことがわかった。つまり、ある程度のところまでは、平面ディッシュ上の環境下で分化誘導を行ったほうが、効率が良いことが分かった。以上の結果より、送液系に組み込む際は iPS-HE の段階で細胞を回収し、それを用いてスフェロイドを形成させた上で、肝組織構築を行うこととした。また、iPS-DE 細胞をスフェロイド上にして包埋した系と、細胞がばらばらの状態で包埋した系との遺伝子発現量の違いを測定した(**Fig. 4.25**)。結果から、スフェロイドにして培養したほうが、iPS 細胞の分化が進んでいることが分かったため、スフェロイドにしてゲルに包埋する系が適していると結論づけた。

Fig. 4.26, 27 に iPS-HE のスフェロイド形成の写真を示す。このように直径が約 150-250 μm 程度のスフェロイドを形成することができた。スフェロイドのサイズは、播種する細胞密度を変更することによって変えることができる。一般にスフェロイド内部への酸素拡散は直径 200 μm 程度が限界と言われているため、本研究では 200 μm 程度のスフェロイドを形成した。200 μm 以上のスフェロイドも作製することは可能であるが、それ以上の大きさのスフェロイドを作製したとしても、内部が壊死してしまい、結果的にスフェロイドの肝機能が低下してしまうためである。スフェロイドプレートに

播種してから 7 日ほどでアルブミン分泌が開始され、10 日ほどで、アルブミン分泌が 100 ng/ml を超える。本研究では、これを指標として、スフェロイド形成から 12-15 日前後のものを使用した。iPS-HE スフェロイドの共焦点顕微鏡画像を、**Fig. 4.28** に示す。このように、非常に均一な形状のスフェロイドを形成することができた。更に、遺伝子発現結果より、スフェロイド形成をする前と比較すると、未分化マーカーや内胚葉マーカーである Oct3/4 や SOX17 の発現量が減少し、ALB や AFP に行った幹細胞マーカーの発現量が上昇した。また、アルブミンの分泌量を初代肝細胞スフェロイドと比べると劣っていることが分かるが、現在の分化効率と分化誘導の度合いから判断すると妥当な値だと思われる(**Fig. 4.29**)。TkDa には予め GFP が導入してあるが、これは分化が進んでも発現が減少することがない。この世運に予め蛍光標識で標識しておくことで、今後送液培養系に充填し肝組織を作製したとしても、非侵襲的に組織内の観察が可能である。

実際の iPS-HE スフェロイドを用いた肝組織作製の手順を **Fig. 4.32** に示す。iPS-HE スフェロイド血管内皮細胞、間葉系幹細胞を GelMa に懸濁し、電気化学的な原理を用いて血管構造を作製した(**Fig. 4.33**)。その結果、iPS-HE スフェロイドが血管構造の間に配置された形の組織を作製することができた。更に送液培養を一週間行くと、ゲルに包埋した血管内皮細胞は微小な血管ネットワークを形成していた。更に、共焦点顕微鏡による観察では、微小ネットワークが iPS-HE スフェロイドの周りを取り巻き一部はスフェロイドと繋がる様子が確認できた。個々でさらに、継代数の若い血管内皮細胞を用いて血管構造を形成し、同様に iPS-HE をハイドロゲルに包埋した結果が **Fig. 4.34** である。若い継代数の血管内皮細胞を用いると、更に早い段階(培養 3 日目)で成熟した血管ネットワークを形成していた。これらは、管腔構造になっていることも確認した。更に送液培養を一週間行くと、この血管ネットワークは iPS-HE スフェロイドと完全に融合し、接続の様子が観察できた。また、iPS-HE スフェロイドは元々の丸い形態から形態変化をおこし、増殖しながら、血管ネットワーク内へ遊走している細胞も見受けられた。前章で示したように、このネットワーク構造は、太い送液可能な血管構造と接続していることから、狙い通り送液培地は微小血管構造内を通して肝スフェロイドへと供給できていると考えられる。回収した培地のアルブミン分泌量を測定すると、培養するにつれて分泌量が上昇していくことを確認した(**Fig. 4.35**)。またアンモニアの代謝速度も同様に測定した結果、培養一日目に比べて培養 7 日目にはその代謝速度は 10 倍程度上昇した(**Fig. 4.36**)。また、前節で行った初代肝細胞スフェロイドを用いた結果と比べるとアルブミン分泌量は約半分、アンモニア代謝速度は約 4 分の 1 程度であった。**Figure 4.37** に送液培養 0 日目に対しての送液培養 7 日目の遺伝子発現量の変化を示す。Nanog, Oct3/4 といった発現量は非常に低く、更に一週間の間に減少していた。また、AFP, FOXA2 などの肝細胞に普遍的な分化マーカーの発現量も上昇し、SOX17 や HNF4a と言った内胚葉マーカーの発現量は減少していた。更に、PEPCK, G6PC, αAT, TTR などの成熟肝細胞のみに発現する遺伝子はすべて上昇し、RBP4 は 50 倍、ALB は 100 倍以上発現量が上昇した。このことから、組織内に充填した iPS-HE スフェロイドは送液培養中でも確実に成熟した肝細胞へと分化していることを確認した。一方で、今回の送液培養に用いた培地は EGM-2 であり、これは血管内皮細胞のための培地であるため、分化誘導因子は入れていない。これは肝細胞の分化よりも、血管ネットワーク形成を優先したため

である。今後は、送液する培地に、HGF などの分化誘導因子を加えて送液培養を行うことで、この血管構造を備えた肝組織を成熟した肝組織に誘導できると考えている。

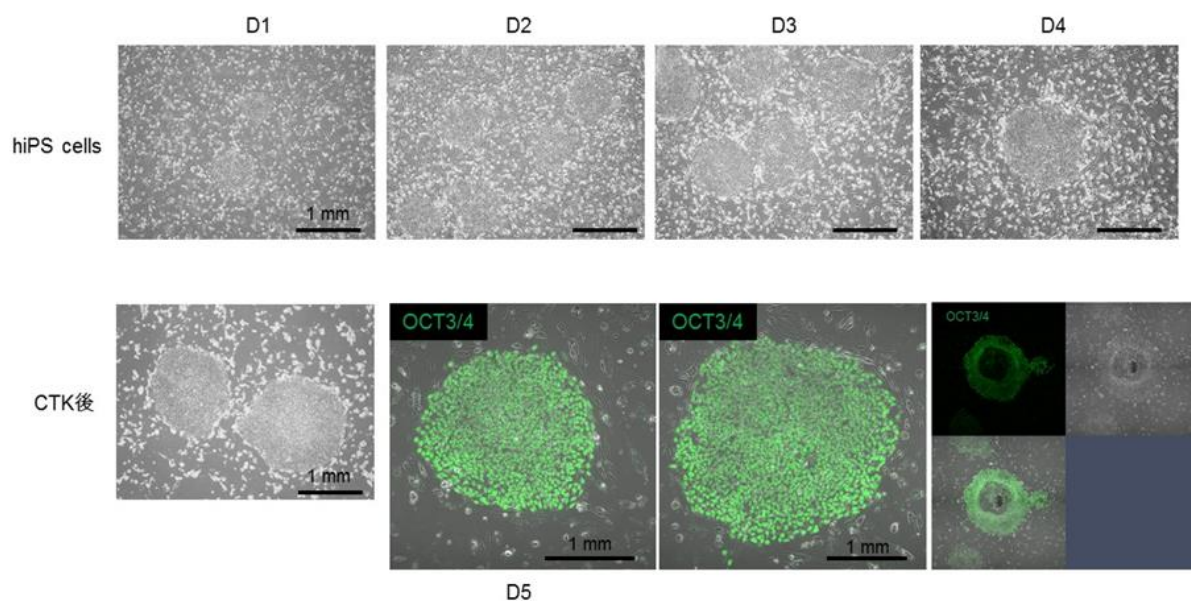


Figure 4.20 SNL(feeder)細胞上の iPS 細胞と未分化マーカーである OCT3/4 の染色

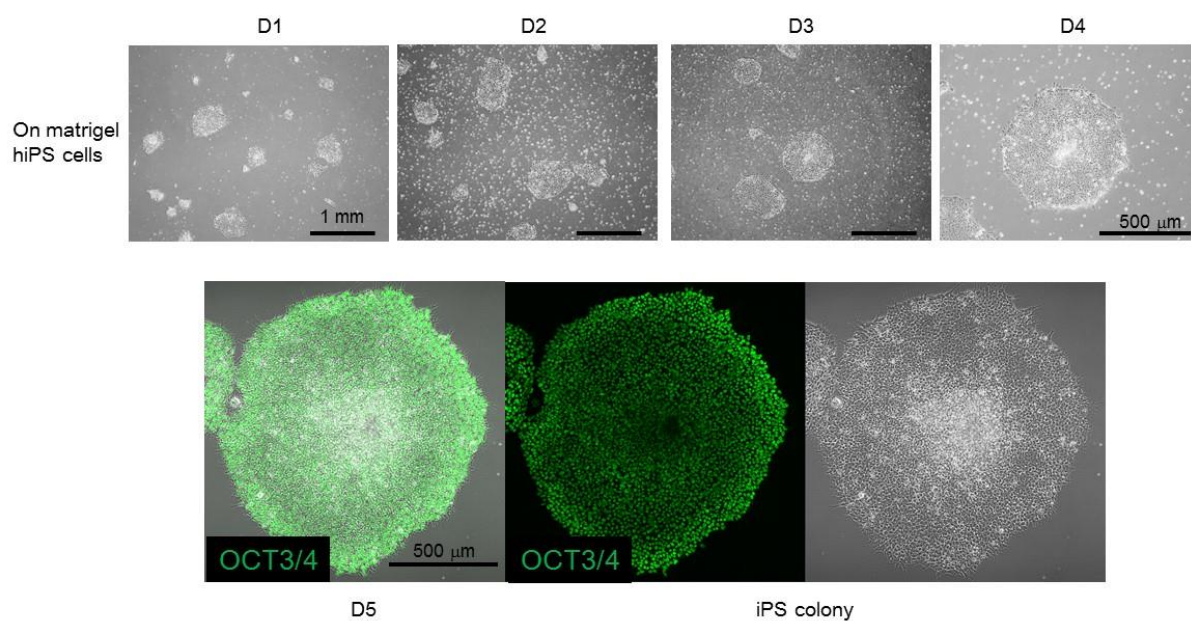


Figure 4.21 SNL,feeder 細胞上の iPS 細胞と未分化マーカーである OCT3/4 の染色

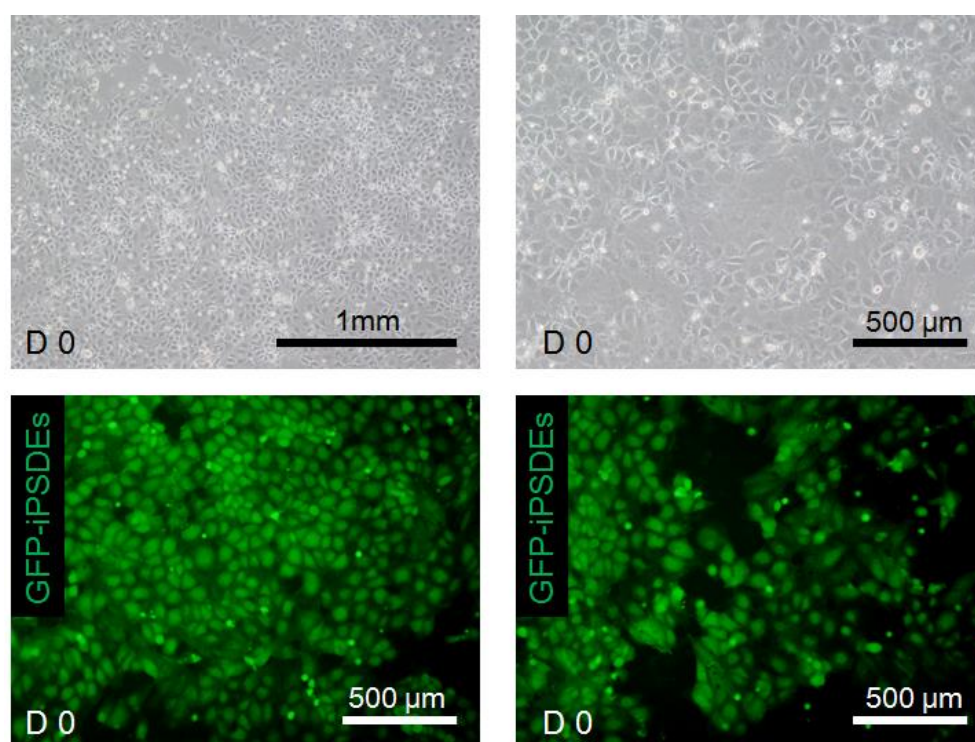


Figure 4.22 iPS-DE 細胞分化 0 日目

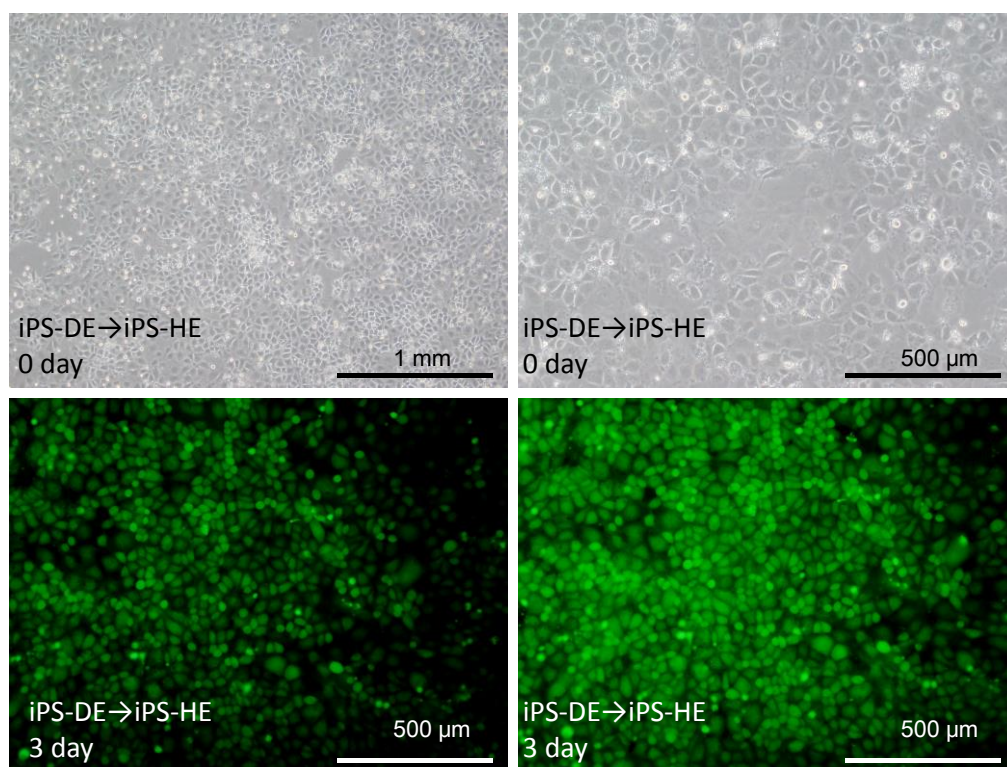


Figure 4.23 iPS-HE 細胞分化 0 日目、3 日目

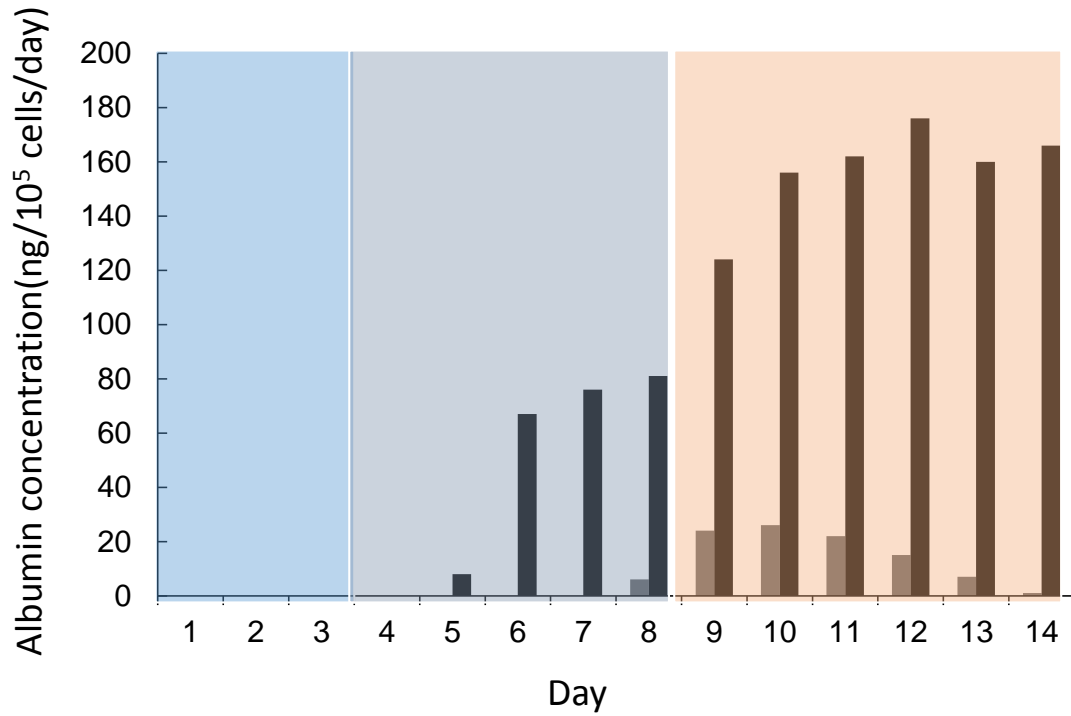


Figure 4.24 iPS-DE と iPS-HE のアルブミン分泌量の違い
黒:iPS-HE 灰色:iPS-DE

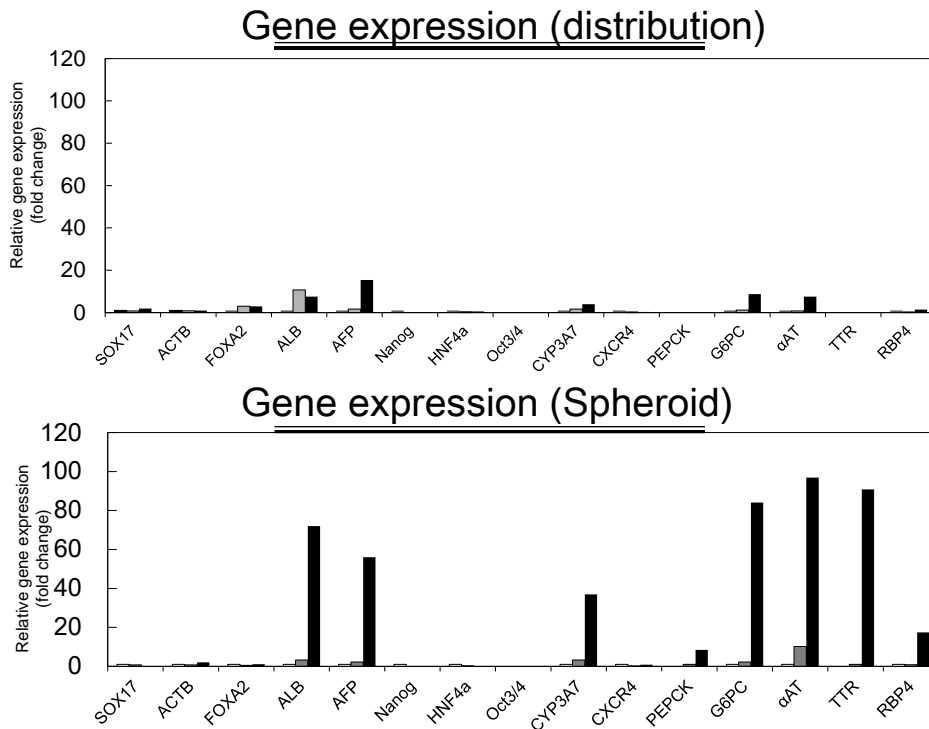


Figure 4.25 iPS-DE のスフェロイド包埋培養と単細胞包埋培養での分化マーカーの
発現量の違い(from Total RNA)

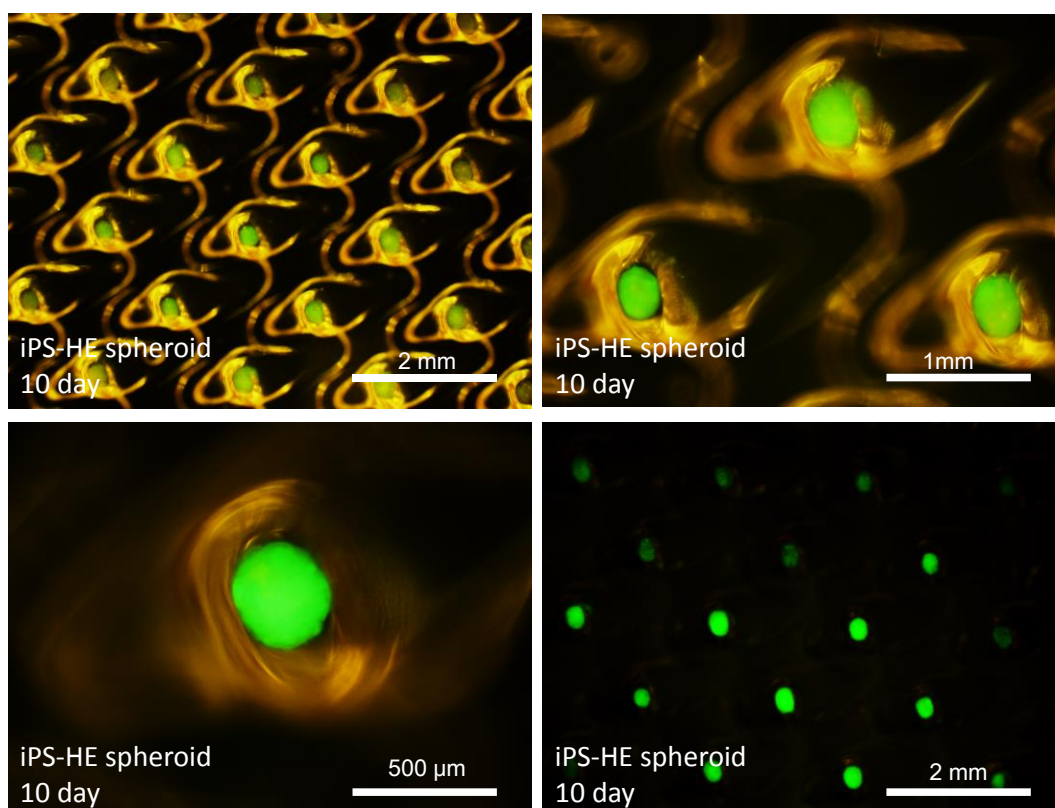


Figure 4.26 iPS-HE のスフェロイドの形成と GFP が導入された iPS-HE スフェロイド

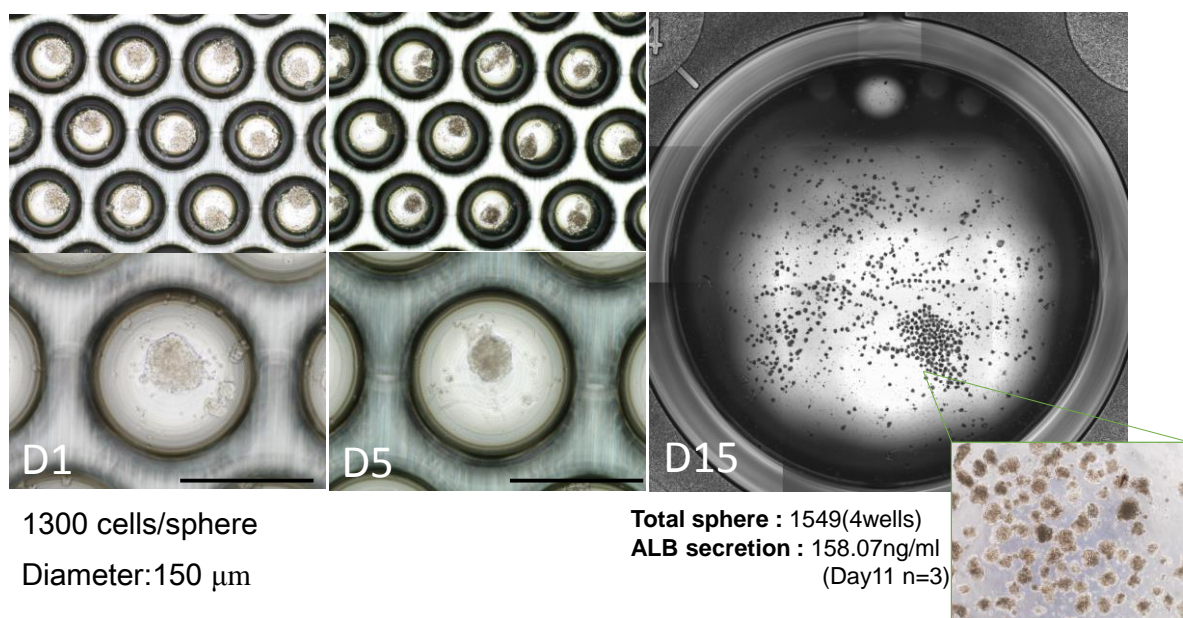


Figure 4.27 kuraray Elplasia を用いた iPS-HE のスフェロイドの形成とスフェロイドの回収、回収時のアルブミン分泌量:150 ng/ml

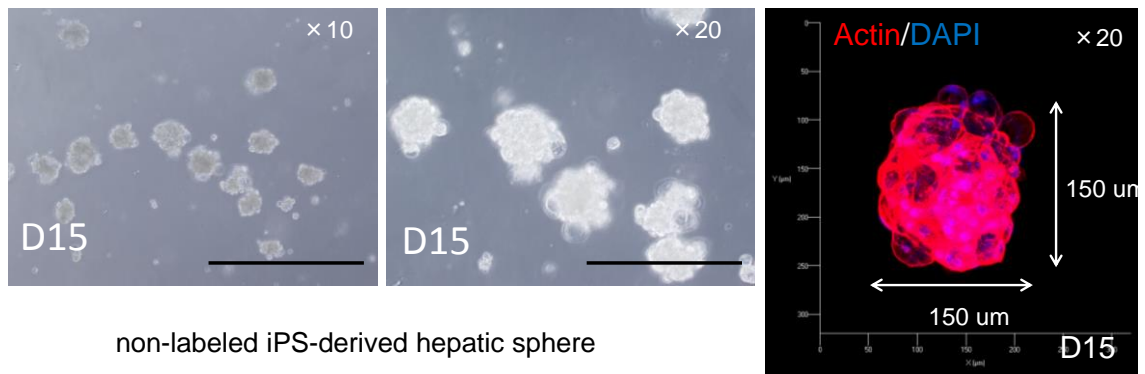


Figure 4.28 iPS-HE の細胞骨格染色(赤)と細胞核(青)

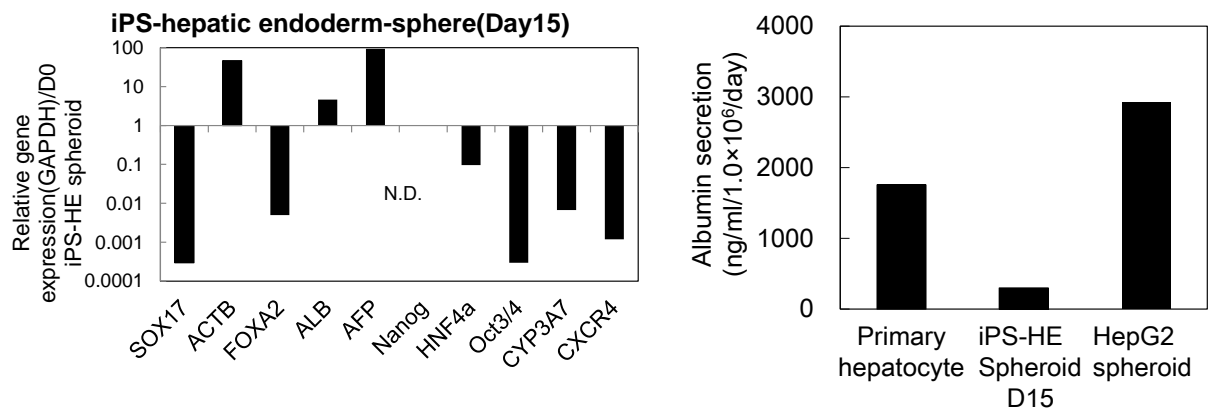


Figure 4.29 iPS-HE スフェロイド(D15)の遺伝子発現解析と初代肝細胞、HepG2 とのアルブミン分泌量の比較

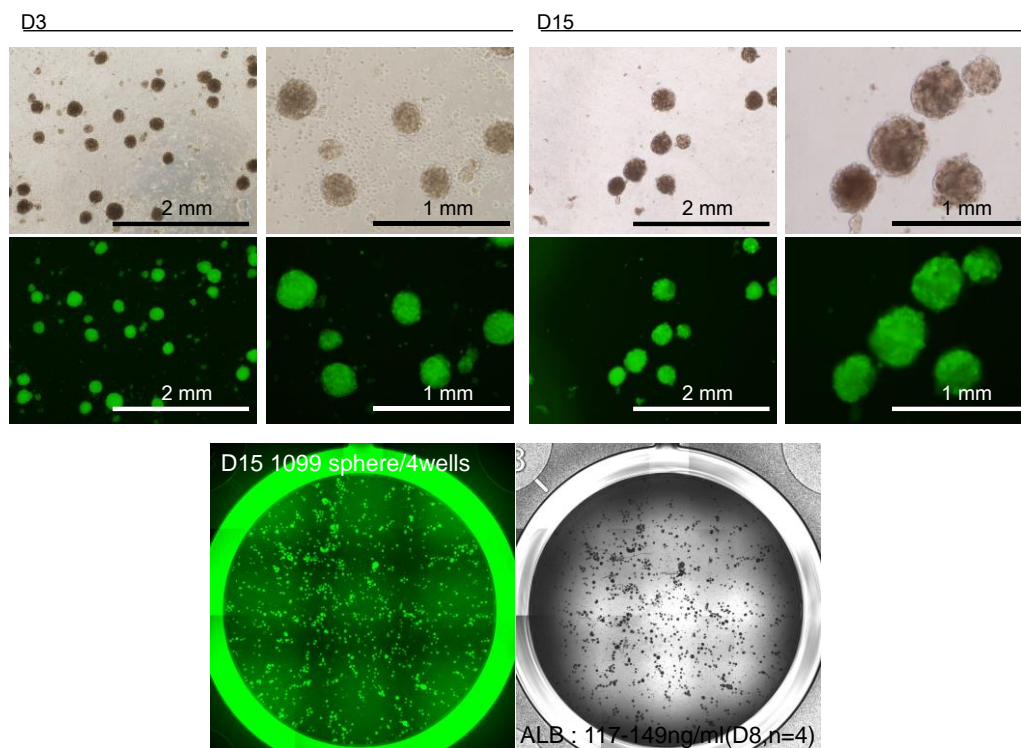


Figure 4.30 GFP-iPS-HE のスフェロイドの形成

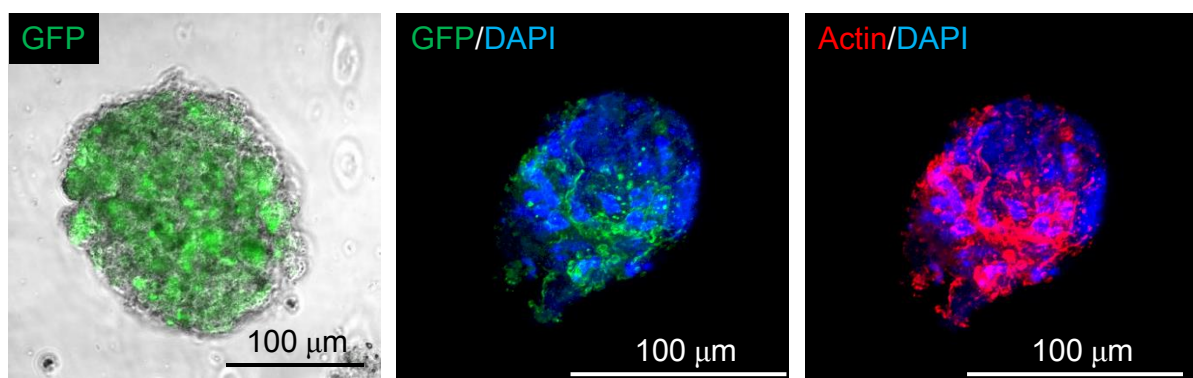


Figure 4.31 GFP-iPS-HE のスフェロイドの形成

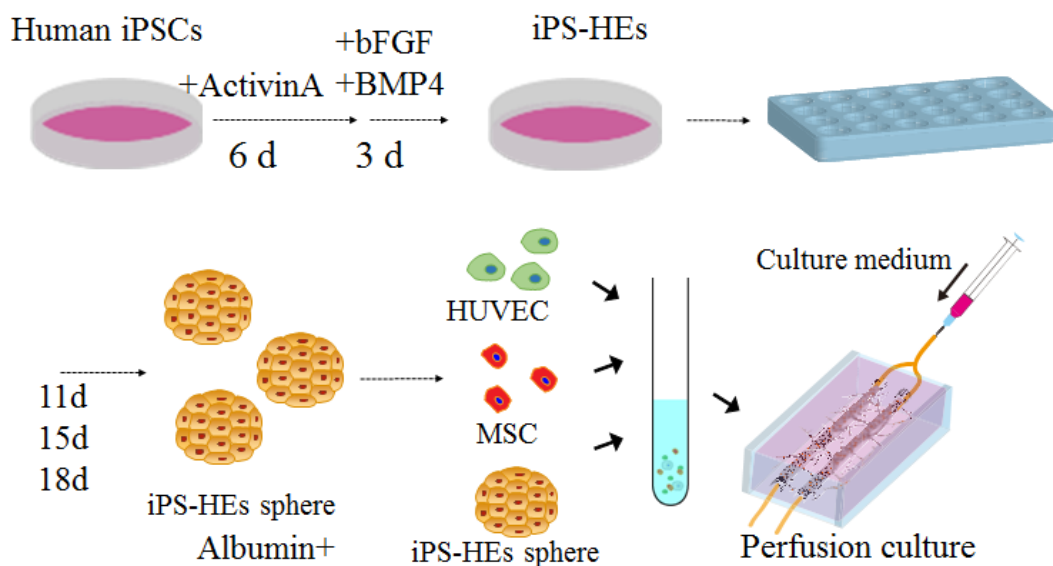


Figure 4.32 GFP-iPS-HE のスフェロイドを用いた 3D 肝臓類似組織の作製手順

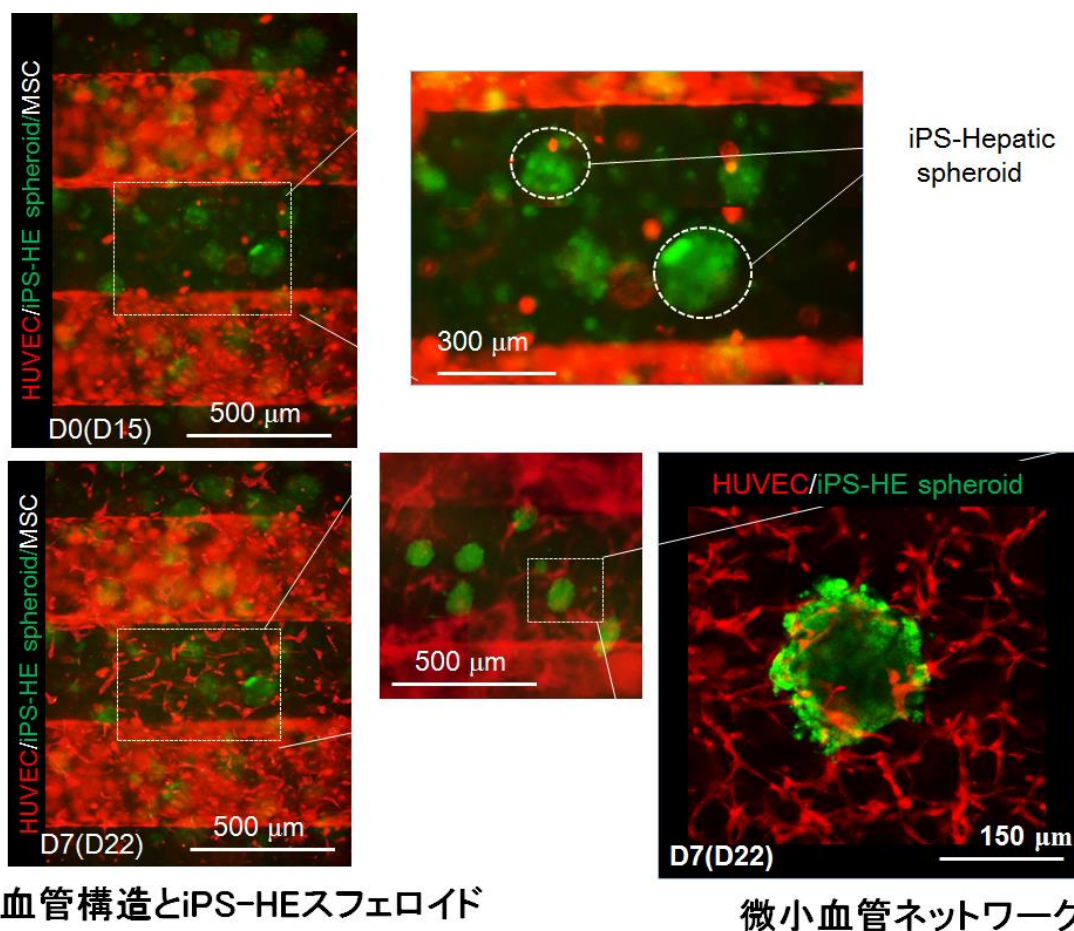


Figure 4.33 三次元肝臓類似組織の蛍光顕微鏡写真、送液培養後 D0→D7 培養 7 日後には iPS-HE スフェロイドの周りを取り巻くように HUVEC の微小血管ネットワーク構造が張り巡らされている。

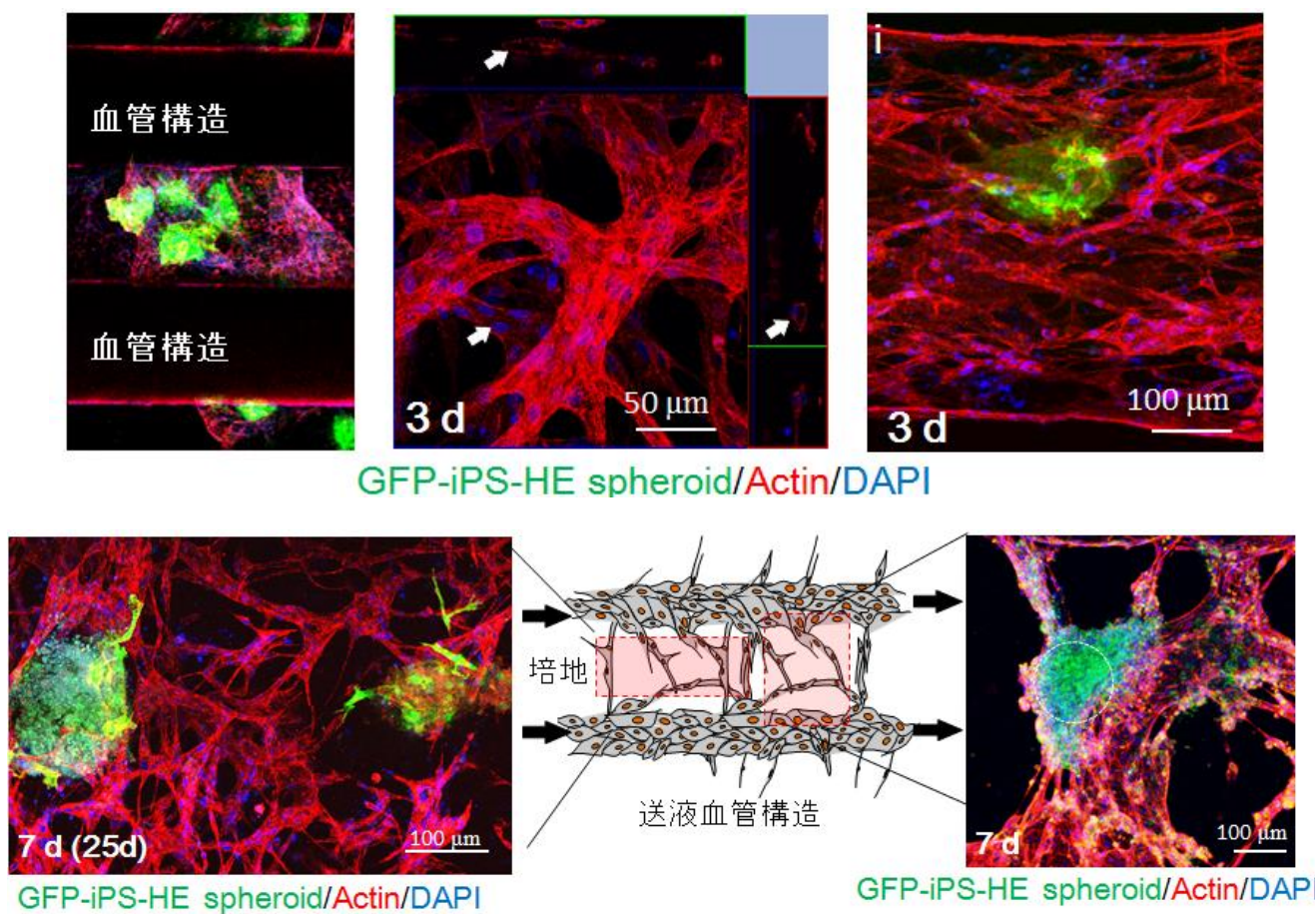


Figure 4.34 GFP-iPS-HE のスフェロイドを用いた三次元肝臓類似組織の共焦点顕微鏡写真
培養から 3 日後、7 日後
(下)GFP-iPS-HE スフェロイドの形態変化と HUVEC の微小ネットワークとの細胞間結合
の様子

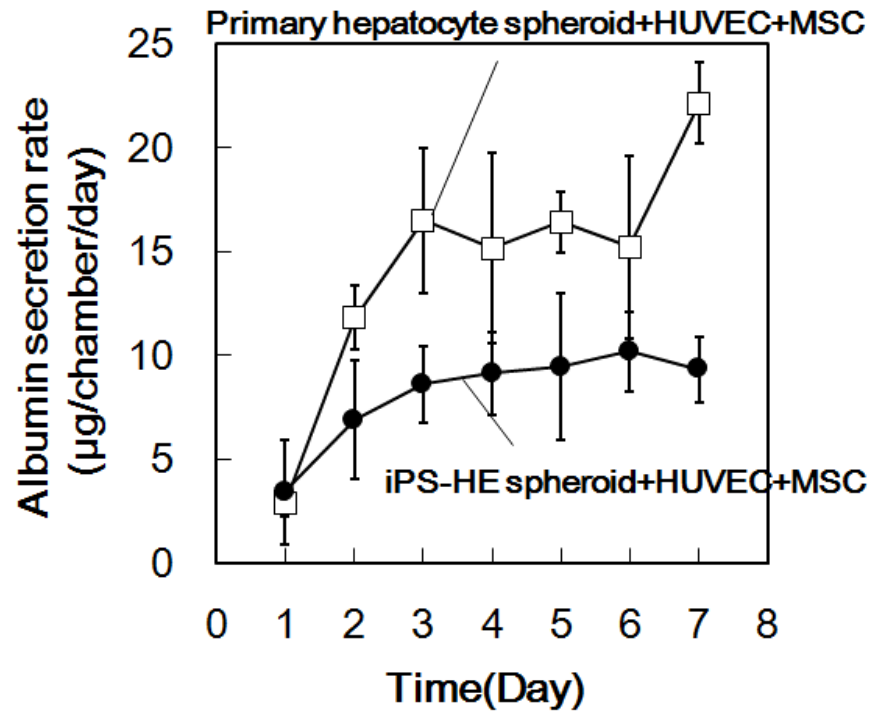


Figure 4.35 回収した培地から求めたアルブミン分泌量
 □初代肝細胞スフェロイド+HUVEC+MSC、●iPS-HE スフェロイド+HUVEC+MSC

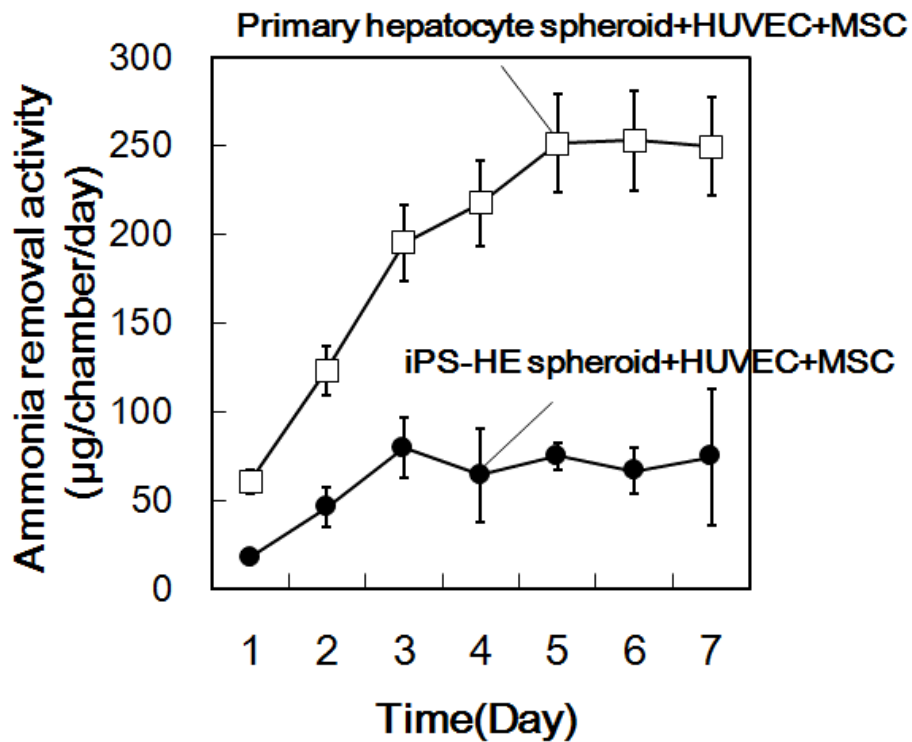


Figure 4.36 回収した培地から求めたアンモニア代謝速度
 □初代肝細胞スフェロイド+HUVEC+MSC、●iPS-HE スフェロイド+HUVEC+MSC

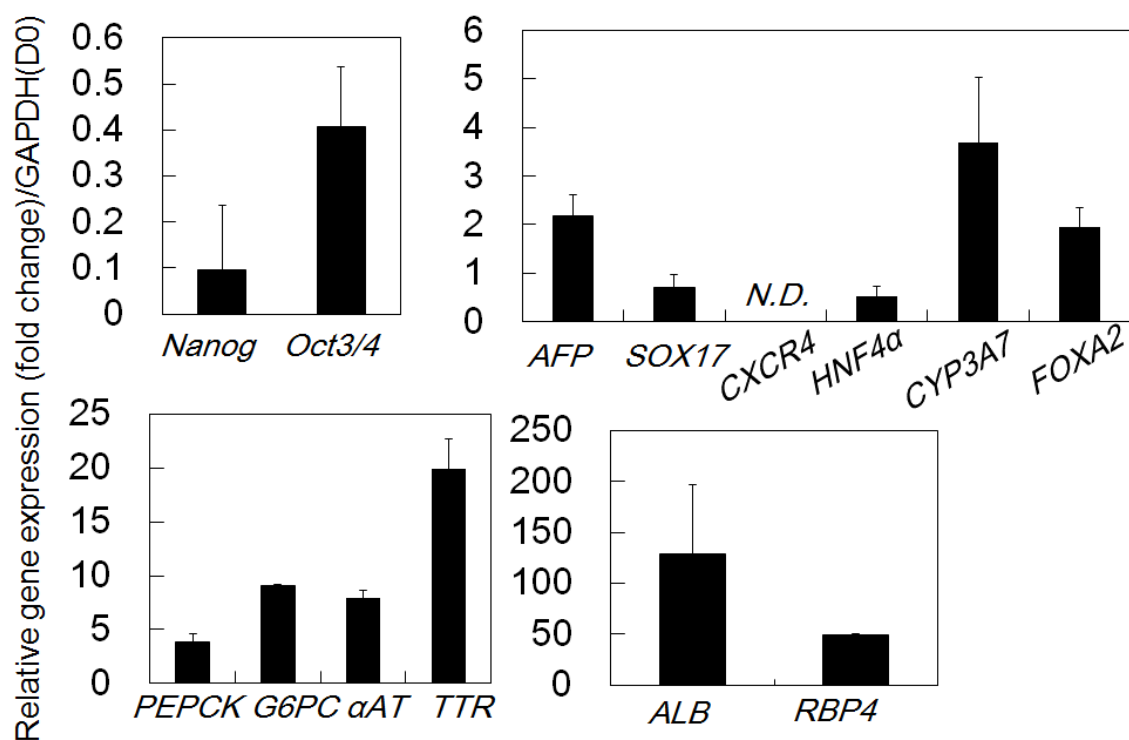


Figure 4.37 送液培養 7 日後の肝臓類似組織の遺伝子発現解析 from total RNA
基準 送液培養前の iPS-HE スフェロイドを含んだ組織体

4.5 本章のまとめ

本章では、まず、肝組織作製のための肝スフェロイドの形成について検討した。その後、iPS 細胞から肝細胞へと誘導し、それを用いたスフェロイド作製を行った。更に、このスフェロイドを用いて前章の電気化学的な血管構造作製手法と組み合わせ、立体的な肝組織を作製した。その結果、アルブミン分泌量とアンモニア代謝を行う iPS 細胞由来の肝組織を構築することができた。

4.6 参考文献

- [1] Timmins N, Dietmair S, Nielsen L. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis*. 2004;7:97-103.
- [2] Tong JZ, Sarrazin S, Cassio D, Gauthier F, Alvarez F. Application of spheroid culture to human hepatocytes and maintenance of their differentiation. *Biology of the Cell*. 1994;81:77-81.
- [3] Anada T, Fukuda J, Sai Y, Suzuki O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials*. 2012;33:8430-41.
- [4] Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, et al. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell*. 2015;16:556-65.
- [5] Song Z, Cai J, Liu Y, Zhao D, Yong J, Duo S, et al. Efficient generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell research*. 2009;19:1233-42.
- [6] Sullivan GJ, Hay DC, Park I-H, Fletcher J, Hannoun Z, Payne CM, et al. Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51:329-35.
- [7] Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010;51:297-305.
- [8] D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotech*. 2005;23:1534-41.
- [9] Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat Protoc*. 2014;9:396-409.
- [10] Kajiwarra M, Aoi T, Okita K, Takahashi R, Inoue H, Takayama N, et al. Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells (vol 109, pg 12538, 2012). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:14716-.

第五章

腹腔内留置を目的としたデバイスの開発と肝組織の移植

5.1 はじめに

前節では、iPS 細胞から誘導した肝前駆細胞と電気化学的な血管構造作製手法、さらには、自己組織的な微小血管ネットワークの形成を用いて、立体的な肝組織を構築してきた。そしてその組織は、*in vitro* において、アンモニア代謝やアルブミン分泌といった機能を有する組織となった。今後、移植組織として用いるためには、動物に実際に作製した組織を移植してその治療効果を確認する必要がある。一方で、この組織の特徴は、組織内にすでに送液可能な血管構造を有していることである。つまり、この組織の特徴を生かす移植方法は、作製した血管構造を生体の血管構造を直接接続し、血液を介して組織への酸素供給を速やかに開始することであろう。肝臓は、代謝性の臓器であり、血液を浄化する臓器である。そのため、移植する際には、血液と接続できる環境であれば、どこでも移植可能な臓器である。つまり、肝組織は異所移植可能な組織体である。そのため、これまで重篤な肝疾患患者には、血漿交換療法や、血液ろ過透析、血液吸着療法など、血液を体外に循環させ血液をきれいにすることで治療する方法が用いられてきた。しかし、このような人工肝臓を用いる治療方法は、血液体外循環が不可欠であり、血液体外循環流量を低下させたとしても、患者さんへの身体的負担が大きくなるため、長期にわたる治療としての適用は大きく制限される。そこで、本研究では、移植方法を血液と直接吻合する方法を採用し、さらに、血液ロスを最小限にする体内埋め込み型の治療方法を提案する。本研究が想定する実際の適用方法を **Fig. 5.1** に示す。

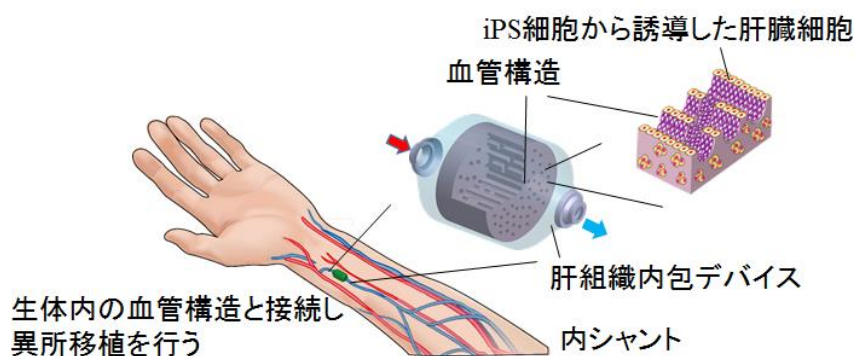


Figure 5.1 本研究で提案する実際の治療形態

これを実現するために、本章では、直接血管吻合を行えかつ、血圧による圧力がかかる環境下でも作製した組織が維持できるチャンバーを新たに開発し、実際にマウスの血液と吻合することによって、上記の治療方法の可能性を示す必要がある。さらに、実際に、治療効果を実証するためにマウス肝細胞を抽出しデバイスに充填することで、マウス由来の肝細胞を用いた立体的な肝臓デバイスを作製した。最後に、それをマウスの血管構造と吻合移植した上で、腹腔内に留置し、マウスの血液から、移植デバイスが機能しているかどうかを検証した。

5.2 血管吻合のためのデバイス開発

5.2.1 はじめ

これまで、作製してきた立体的な肝組織は、周りがアクリルのチャンバーで覆われたデバイスの中に構築してきた。これは、*in vitro* で培養することを想定し、作製の容易なアクリルを用いてきた。*In vitro* で培養する限りでは、アクリルで作製したチャンバーにまったく不具合はなかった。しかし、*in vivo* つまり、血管構造と直接接続して、それを腹腔内に留置するには、アクリル製のチャンバーは適していない。アクリルは、器具滅菌によく用いられるオートクレーブができないため、滅菌性に問題がある。また、これまで用いてきたチャンバーは送液しているものの血管内にある力がかかるわけではなかった。しかし、マウス血管構造と接続すると血管壁内壁もしくはチャンバー全体に血圧がかかる。アクリル製のチャンバーは血圧に耐えられる構造ではないので、*in vivo* で用いるためにはチャンバーの設計変更が必要であろう。また、チャンバーの大きさと組織の大きさも重要である。腹腔内に留置する以上、マウスの体内に入るサイズでなければならずほかの臓器を圧迫するような大きさのものは用いることができない。つまり、これまで用いてきたアクリルのチャンバーに対して以下の三点の設計変更が必要となった。

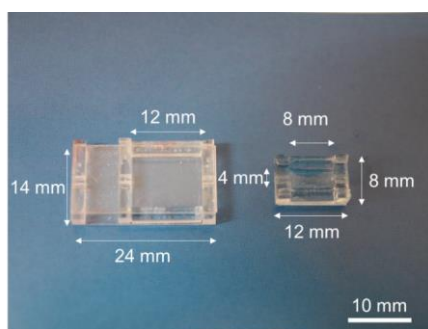


Figure 5.2 これまで実験に用いてきたアクリルチャンバー

1. 血圧に耐えられるチャンバーの開発
2. チャンバーサイズの小型化と腹腔内留置するのに適したチャンバーの開発
3. チャンバーの滅菌性向上

本章では、これらを満たすチャンバーを作製し、それを用いてハイドロゲル内に血管構造を作製する手法を確立した。

5.2.2 本節の目的

本節では、生体の血管構造と接続し且つ、体内に留置するのに適したチャンバーの開発を行った。

5.2.3 素材の選定

組織内に留置するためのデバイスの素材は、生体材料(Biomaterial)とよばれ、材料から体液中に析出した成分が細胞、組織、臓器に対して生理学的な悪影響を及ぼすことのない素材でなければなら

い。例えば、高分子材料のモノマーや金属イオン、セラミックイオンは細胞に対して深刻なダメージを与え、生体内の炎症反応を引き起こす。生体材料もその目的や性質に合わせて様々な材料が開発されている。金属であれば、ステンレス鋼、コバルト合金、チタン合金などが良く用いられ、これらはステン、人工心臓弁、人工関節、などに応用されている[1]。セラミックは、主に硬組織の修復に用いられヒドロキシアパタイトは骨再生によく用いられている材料である。一方で、合成高分子では、ナイロンやポリプロピレン、ポリエステル繊維が用いられ、血流と直接接触する場合には PTFE やシリコンなど様々な材料が開発されている。本研究で用いるデバイスは、直接血流に接触する可能性があり、かつ、観察を容易にするために、PTFE もしくはシリコン系の素材が適していると考えた。

5.2.4 生体内の血圧

血液は、心臓による拍動によって組織へと運ばれてくるが、血管内壁には常に血圧が生じる。ヒトの動脈では、常に 80-150 mmHg の血圧がかかっており、静脈の場合でも 15 mmHg 程度の圧力がかかる。門脈にも 100-150 mmHg の圧力がかかる。したがって、直接血管と接続し移植する場合には、この血圧がデバイスにかかったとしても、血圧に十分耐えられる設計で、且つ、血液が漏れることのないチャンバーを設計する必要がある。

5.2.5 チャンバーサイズ

体内に埋め込む際には、チャンバーの物理的な大きさも考慮する必要がある。本研究では、マウスに移植しその治療効果を証明する予定であるので、マウスに適したチャンバーを設計する。例えば、体重約 30-35g の CD1:ICR マウスの肝臓は約 1-1.5g であるため、移植するゲルのボリュームも 1-1.5g 程度を想定している(http://www.crj.co.jp/cms/pdf/info_common/30/6769010/control_data_ICR_apr_2010ca.pdf)。つまり体積的には、1 cm³ 程度の組織対を移植する必要がある。

5.2.6 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss LSM700)

【試薬】

- ・PDMS(ポリジメチルシロキサン)、信越シリコン
- ・PTFE チューブ
- ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・タイゴンチューブ(Φ0.5 mm)

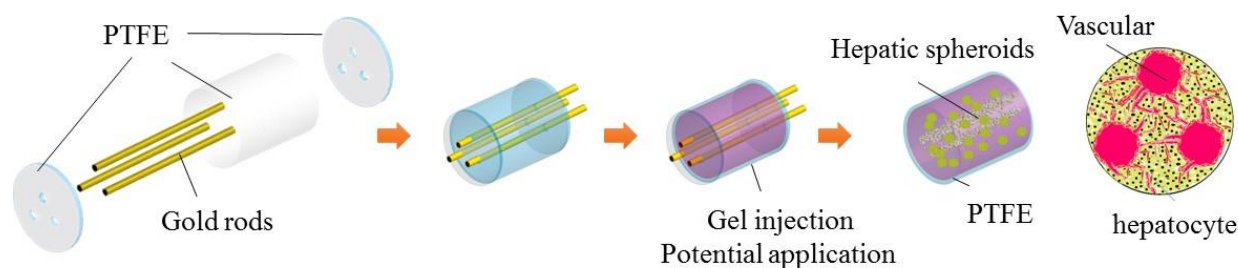


Figure 5.3 PTFE 円柱型チャンバーを用いた肝組織作製の模式図

- ・ タイゴンチューブ(Φ1.0 mm)

【実験手順-PTFE チャンバーの作製-】

PTFE チューブの穴あけ加工

外形 8mm の PTFE ロッドを長さ 1.5cm に切りそろえる。その後、フライス盤を用いて直径 5.5mm の貫通穴を開ける。

PTFE チューブのタップ立て

タップを用いて直径 5.5mm の穴にコネクターを接続するためのねじを切る。

PTFE チャンバーの組み立て

加工したチャンバー、アイシスコネクタ、O リングを片側だけ、組み立てる。

血管構造の作製

前章と同様の手順でチャンバー内に血管構造を作製する。ハイドロゲルのボリュームは 1 ml。光照射時間は 90 秒とした。またこの時、ハイドロゲル側には血管内皮細胞は加えていない。

チャンバーの組み立て

もう片側のコネクターを接続し、肝組織デバイスを完成させる。

血管構造の送液培養

両側のコネクターにタイゴンチューブを接続し、培地を送液する。

【実験手順-PDMS-PTFE チャンバーの作製-】

PTFE チューブの穴あけ加工

外形 6 mm の PTFE ロッドを長さ 0.3cm に切りそろえる。その後、フライス盤を用いて直径 5.5mm の貫通穴を開ける。これをコネクションベースとする。

PTFE チューブのタップ立て

タップを用いて直径 5.5mm の穴にコネクタを接続するためのねじを切る。

PDMS メインチャンバーの作製

信越シリコン PDMS と硬化剤を 10:1 で混ぜあわせ、予め作製しておいた内径が 8 mm のアクリルプレートに流しこむ。この時アクリル内には PTFE コネクションベースを設置しておく

PDMS-PTFE チャンバーの組み立て

加工したチャンバー、アイシスコネクタを片側だけ、組み立てる。

血管構造の作製

前章と同様の手順でチャンバー内に血管構造を作製する。ハイドロゲルのボリュームは 1 ml。光照射時間は 90 秒とした。またこの時、ハイドロゲル側には血管内皮細胞は加えていない。

チャンバーの組み立て

もう片側のコネクタを接続し、肝組織デバイスを完成させる。

血管構造の送液培養

両側のコネクタにタイゴンチューブを接続し、培地を送液する。

5.2.7 実験結果と考察

生体適合性の観点から、PTFE と PDMS-PTFE を組み合わせたチャンバーを作製した(**Fig. 5.4**)。PTFE チャンバーとコネクタの間には O リングを配置した。このようにすることで、送液した時の液漏れを防ぐことができた。PDMS-PTFE チャンバーの場合には、PDMS それ自体が O リングの役割を担うため O リングは不要であった。PTFE と PDMS-PTFE を組み合わせたチャンバーを共に血管構造を作製し、送液培養を行ったところ、液漏れを起こすことなく、1 週間以上送液培養することが可能であった。このチャンバーであれば、たとえマウスの血管構造と接続したとしても、血液が漏れだすことなく移植可能であると考えられる。一方で、PTFE チャンバーは、光透過性が低いため、*in vitro* で血管構造を観察することは困難である。また PDMS と比べると、酸素透過性が極端に低い。血管構造と接続した後は、血液から十分な酸素が供給されるが、一方で、腹腔内にも大量の酸素が存在する。よって、今後は PDMS と PTFE を組み合わせたチャンバーを用いることとした。この PDMS-PTFE チャンバー内に血管構造を作製し、デキストラン溶液を送液した所、9 本の独立した血管構造内に流れ込む様子が確認できた(**Fig. 5.7**)。

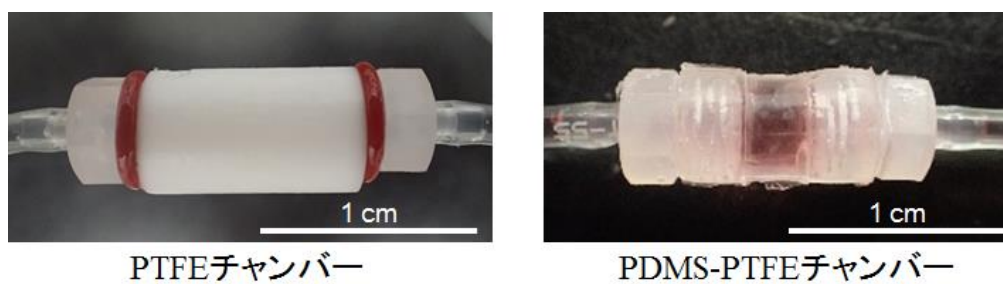


Figure 5.4 PTFE 円柱型チャンバーを用いた肝組織作製の模式図

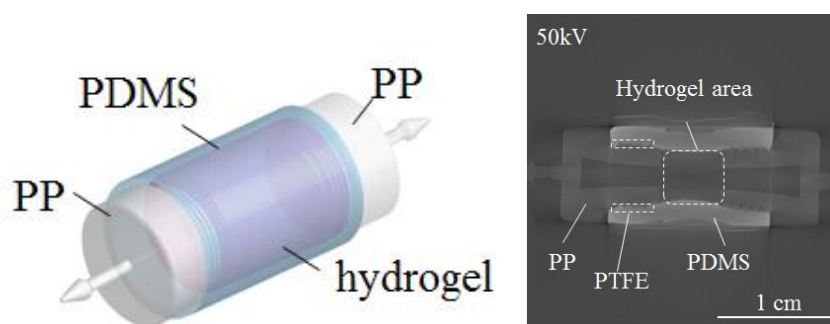


Figure 5.5 マイクロ CT を用いたチャンバーの内部構造

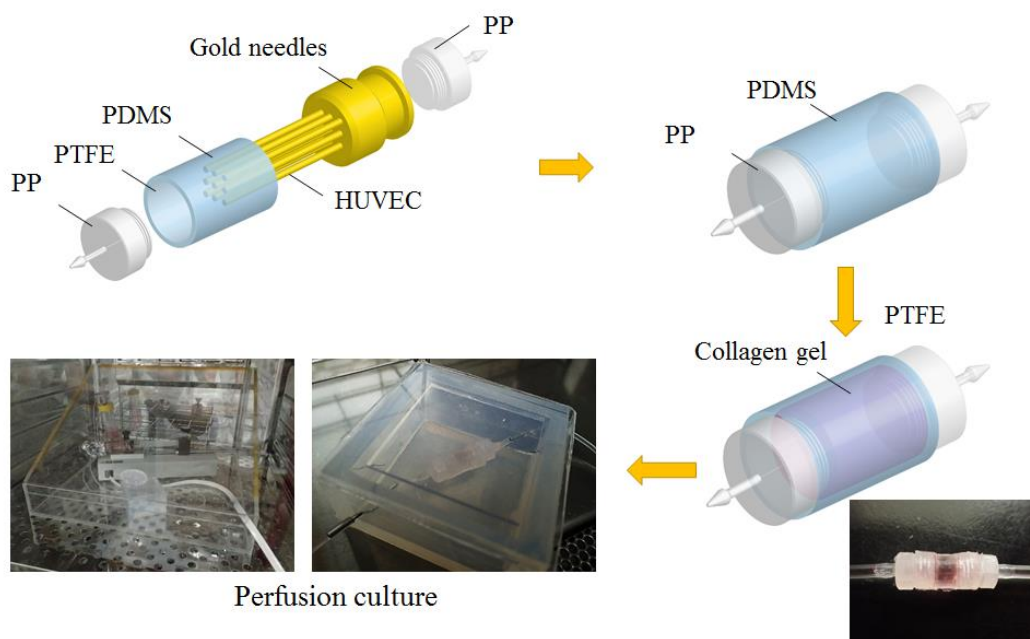


Figure 5.6 PDMS-PTFE チャンバー内への血管構造作製と送液培養

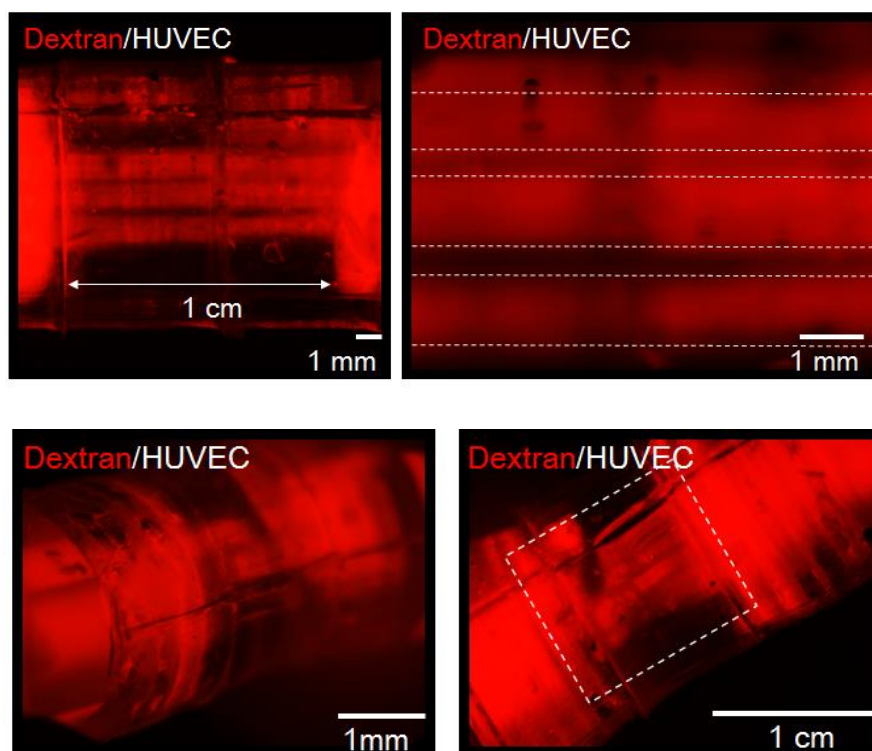


Figure 5.7 PDMS-PTFE チャンバー内に作製した血管構造とその内腔を流れる蛍光デキストラン溶液

5.3 クラニアルウィンドウによる肝組織の移植

5.3.1 はじめに

前節では、吻合を前提としたデバイスの開発を行った。一方で、血管構造を直接吻合しない移植方法も検討すべきであろう。肝組織の移植の場合には、門脈内へ細胞や組織体を注射する方法が古くから用いられてきた。もしくは、血流量が豊富な腸間膜に移植する方法もよく用いられてきた。これらの方法は、どちらも移植後にホストの血管が組織内へと伸長し、その血管構造と、組織内の血管構造が吻合されるプロセスに依存している。したがって、本研究で作製した血管構造とホストの血管構造が接続可能かを検討する必要がある。なぜなら、このホストの血管構造の伸長はせいぜい 2-3 mm 程度であると報告されており、本研究の組織体はそれを大きく上回るサイズであるためである。門脈への居食屋、腸間膜への移植は、簡単であるが移植後に非侵襲的に組織を観察することは難しい。そこで、移植後の血管構造の様子やホストの血管の伸長を観察できるクラニアルウィンドウ法を用いることにした[2] {Takebe, 2012 #305}。この方法による *in vivo* imaging 用いて、作製した送液可能な血管構造へホストの血管構造が伸長し血流が再開するかどうかを検証した。

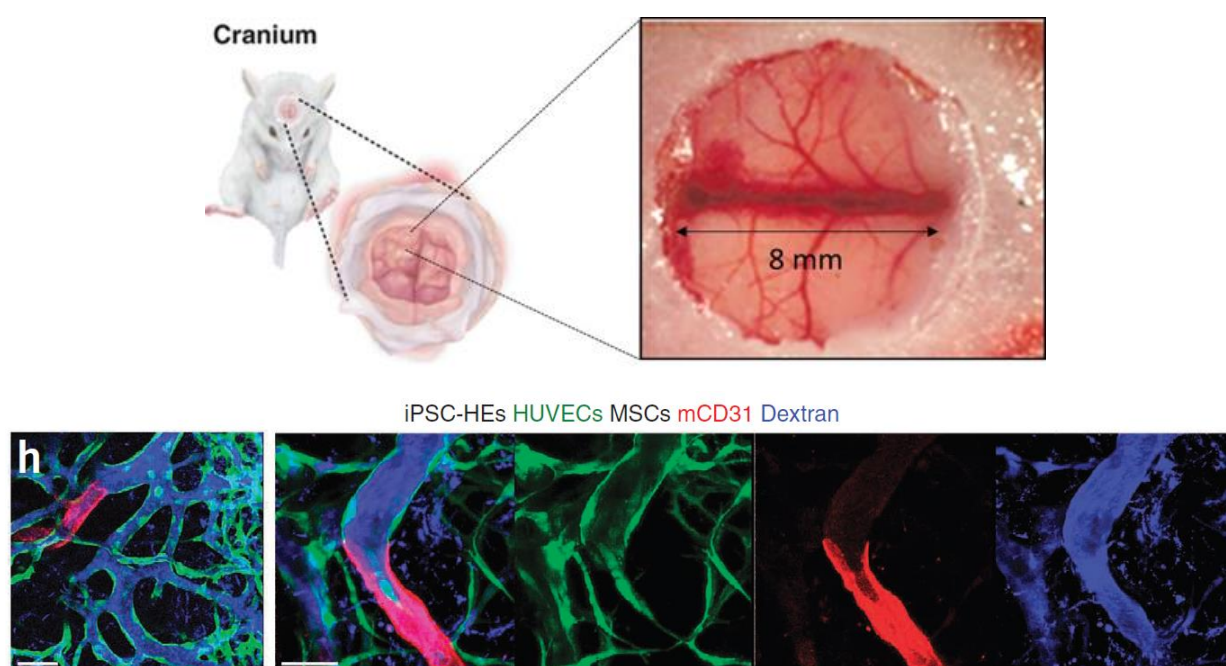


Figure 5.8 クラニアルウィンドウによる血管構造観察と移植片との血管吻合[2]

5.3.2 クラニアルウィンドウ

クラニアルウィンドウとは、マウスやラットなどの小動物の頭頂部頭蓋骨および硬膜を円形に取り除き、ウィンドウアダプターを取り付けた後、カバーガラス窓を持つ凸型ウィンドウを接着剤にて固定することによって、脳血管の様子を *in vivo* でイメージングできる方法である[3]。例えば、BBBの研究や、アルツハイマーなどの研究に用いられてきた[4]。脳血管は血流量が多く、血管細胞の働きも活発であるため、近年では、がん組織を大脳皮質上に置き、血管新生阻害剤を添加した時の血管新生の様子を

モニタリングする方法にも用いられてきた[5] [6]。本研究では、マウスにたいしてクラニアルウィンドウを作製し、作製した肝組織を移植した。また、本実験は横浜市立大学の武部貴則准教授との共同研究であり、組織の移植は横浜市立大学にて行った。

5.3.3 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・GFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・C57BL/6 マウス
- ・カバーガラス Φ8mm thickness 0.17 mm
- ・医療用瞬間接着剤, 第一三共

【実験手順】

クラニアルウィンドウマウスの作製

C57BL/6 マウスの頭蓋骨にリユターを用いて直径 8mm 程度の穴を開ける。そしてピンセットとハサミを用いて硬膜を取り除く。その後、カバーガラスをセットして医療用瞬間接着剤でガラスを固定する。この状態のまま、3-4 日飼育を行い、出血が引くのを待つ。頭蓋骨を取り除いた直後は、出血がひどく、内部を観察したり、移植したりするには適していないためである。

移植片の移植

出血が引き、脳血管がよく観察できるようになった後に、カバーガラスをより外し、移植片を大脳脂質にセットする。この際、中心に通る大きな血管上には移植片を置かないようにする。大きな血管の周りは、血管新生しにくい場所であるためである。移植後、カバーガラスを再度固定する。この時、カバーガラス内に空気が入らないように注意する。

今回、移植したサンプルは 3 種類である。

1. 一本の血管構造+iPS-HE spheroid、RFP-HUVEC、MSC を GelMa に包埋した系(Sample)
2. 筒構造はあるが HUVEC が張り付いていない+iPS-HE spheroid、RFP-HUVEC、MSC を GelMa に

包埋した系

3. 筒構造なし+iPS-HE spheroid、RFP-HUVEC、MSC を GelMa に包埋した系 (Control)

移植片の観察

移植後、毎日撮影を行い、蛍光顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡で観察する。

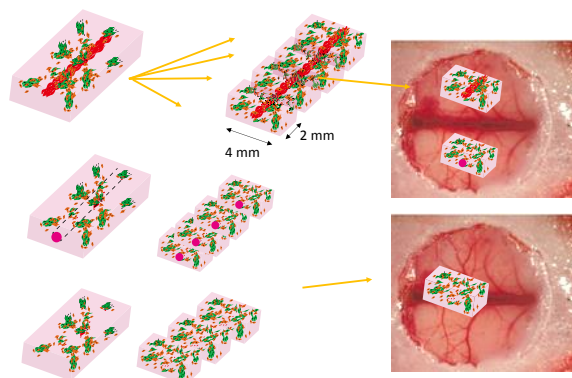
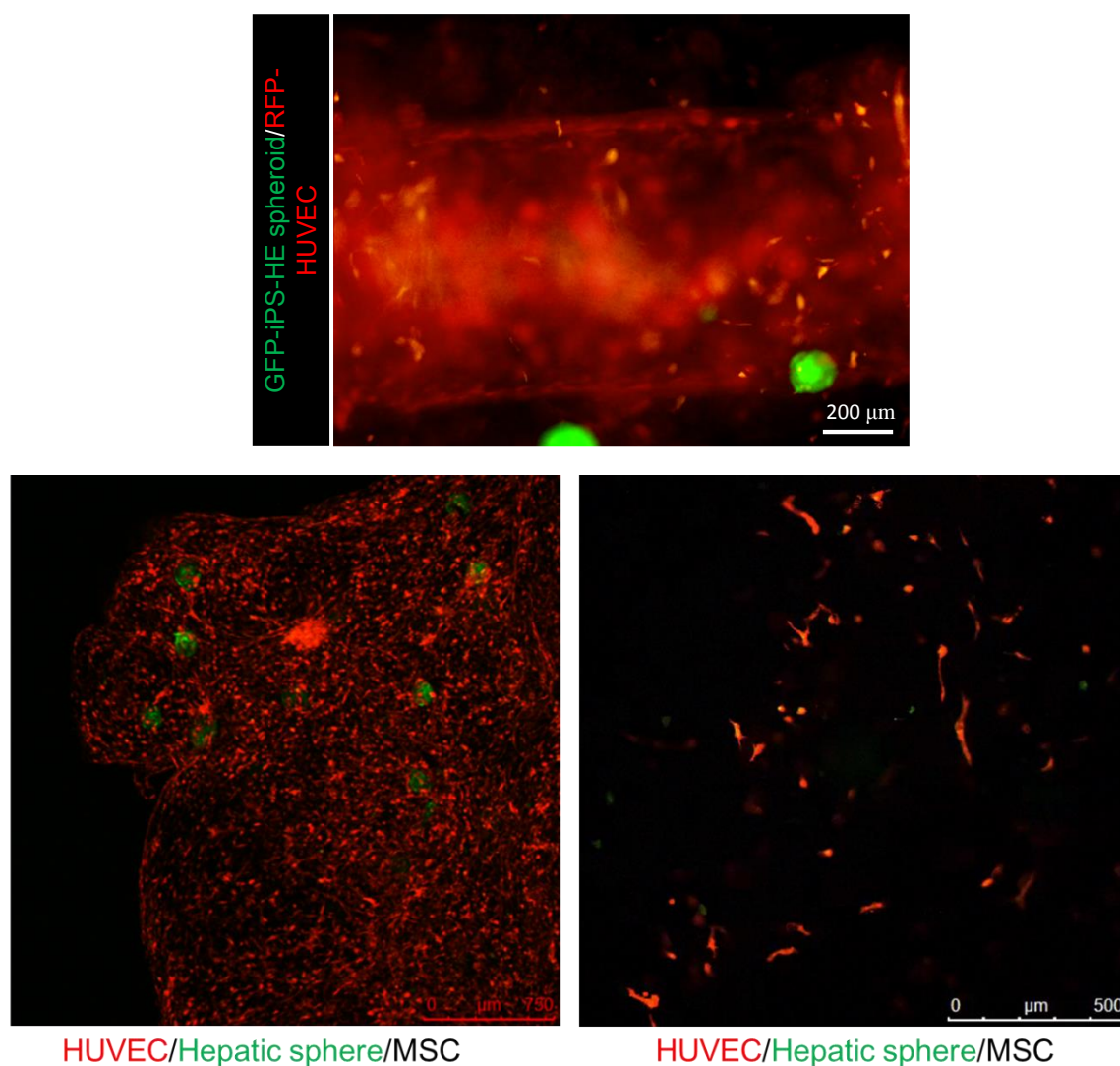


Figure 5.9 クラニアルウィンドウへの移植

5.3.4 実験結果と考察

Fig. 5.10 に移植前の肝組織の画像を示す。この肝組織は送液可能な血管構造が組織内に 1 本配置されており、ハイドロゲルには血管内皮細胞、間葉系幹細胞、iPS 細胞から誘導した肝スフェロイドを懸濁し、前培養を 3 日間行った。**Fig. 5.11** にクラニアルウィンドウ内に移植した移植片のマクロなイメージによる血流の再灌流の結果を示す（移植したエリアが赤点線）。移植すると、サンプル、コントロールともに一旦全体が白くなる様子が観察された。これは炎症初期の免疫細胞の遊走過程であると考えられる（免疫過程）。その後、マウスの血管内皮細胞の遊走を伴いながら、血液が流入していることを確認した（血液流入過程）。このとき、サンプルは **Day4** で送液腔へ血液が流入している様子が確認できた。その後、出血部位は修復され減っていき、完全な血管構造を形成する。**Day 6** の血管構造の様子を **Fig. 5.12** に示す。血液を可視化することができなかったが、この時でも、HUVEC のネットワークと電気化学的に作製した血管構造、及び、iPS 肝スフェロイドは生存していた。一方で、サンプルとコントロールの差は移植後 24 時間で顕著に現れていた。サンプルの方は 24 時間後でも HUVEC のネットワークが保たれているのに対して、コントロールは既に細胞が丸まっている状態で死んでいるように思われる(**Fig. 5.12**)。これは、移植の差というより、送液培養していたか、していなかったということが原因だと推測される。尚、移植したサンプル 3 つの内、送液サンプルのほうが、血液再開が早いという傾向があった。以上のことより、クラニアルウィンドウによる移植によって、送液培養の優位性が見出すことができたが、その効果は限定的であり、最大限に送液培養を行かせている系とは言えない。したがって、送液培養を活かす系、血管と吻合して培養する系を確立しなければならないと考えた。



HUVEC/Hepatic sphere/MS

HUVEC/Hepatic sphere/MS

Figure 5.10 移植前の移植片と直径 500 μm の血管構造(前培養三日目)

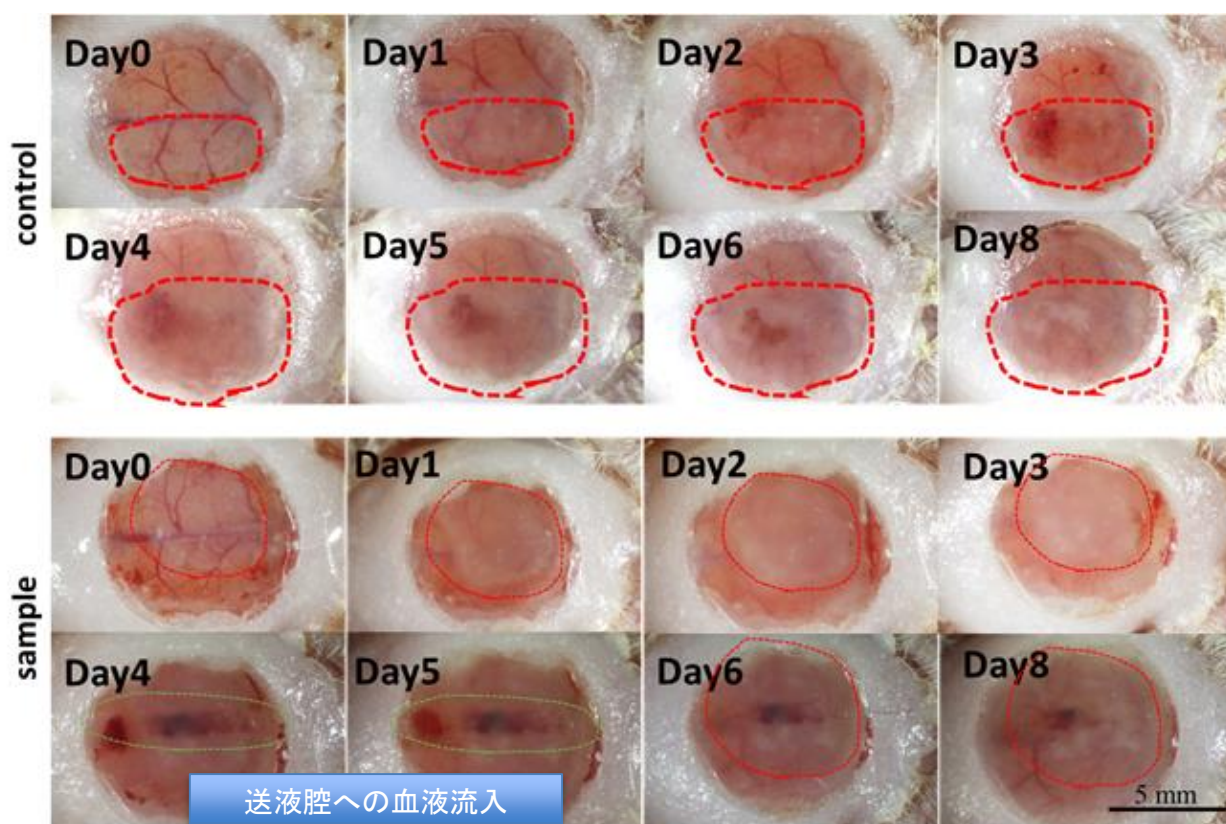


Figure 5.11 移植後の移植片と血管構造の様子

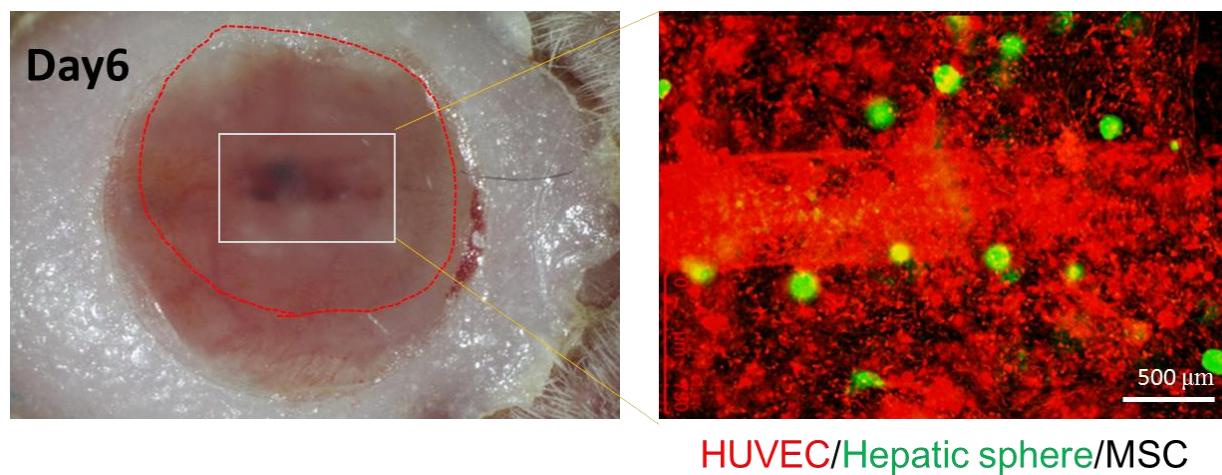


Figure 5.12 移植後 6 日後の脳血管の様子と iPS 細胞から誘導した肝スフェロイドと血管構造

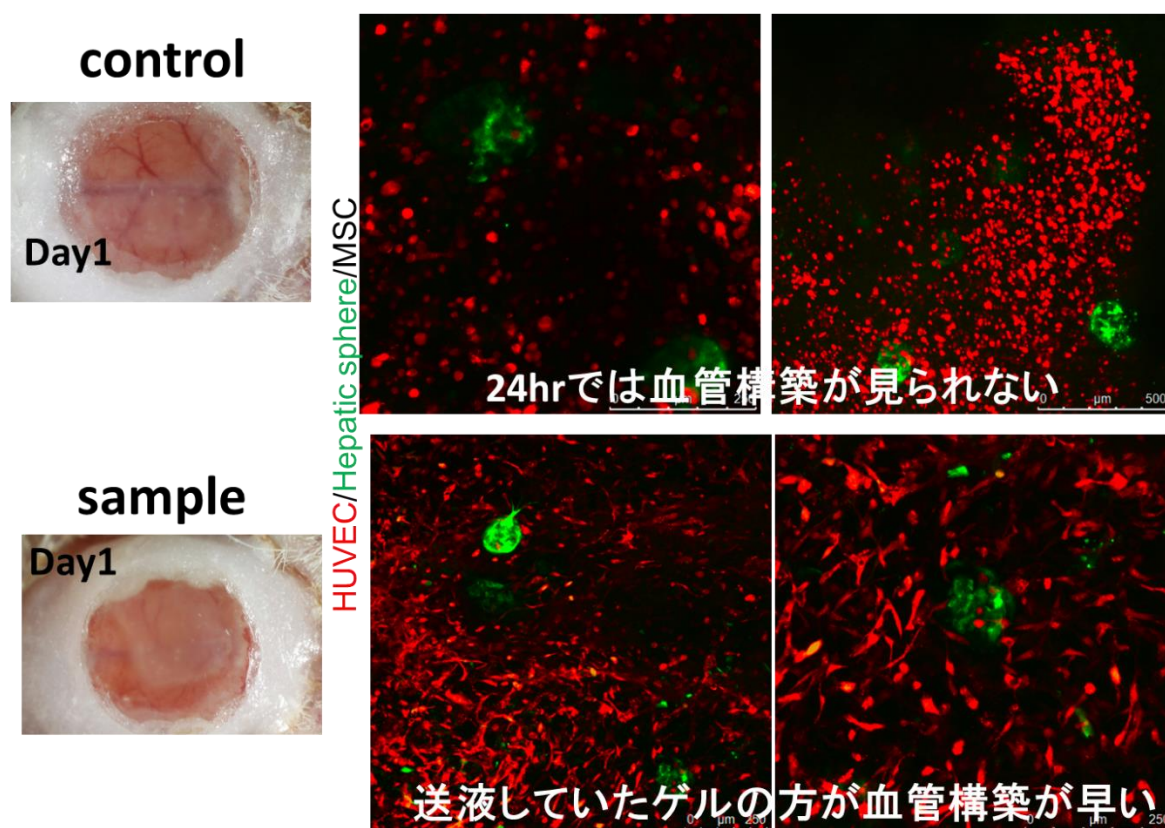


Figure 5.13 送液培養の血管構造と静置培養の血管構造（移植後 24 時間）

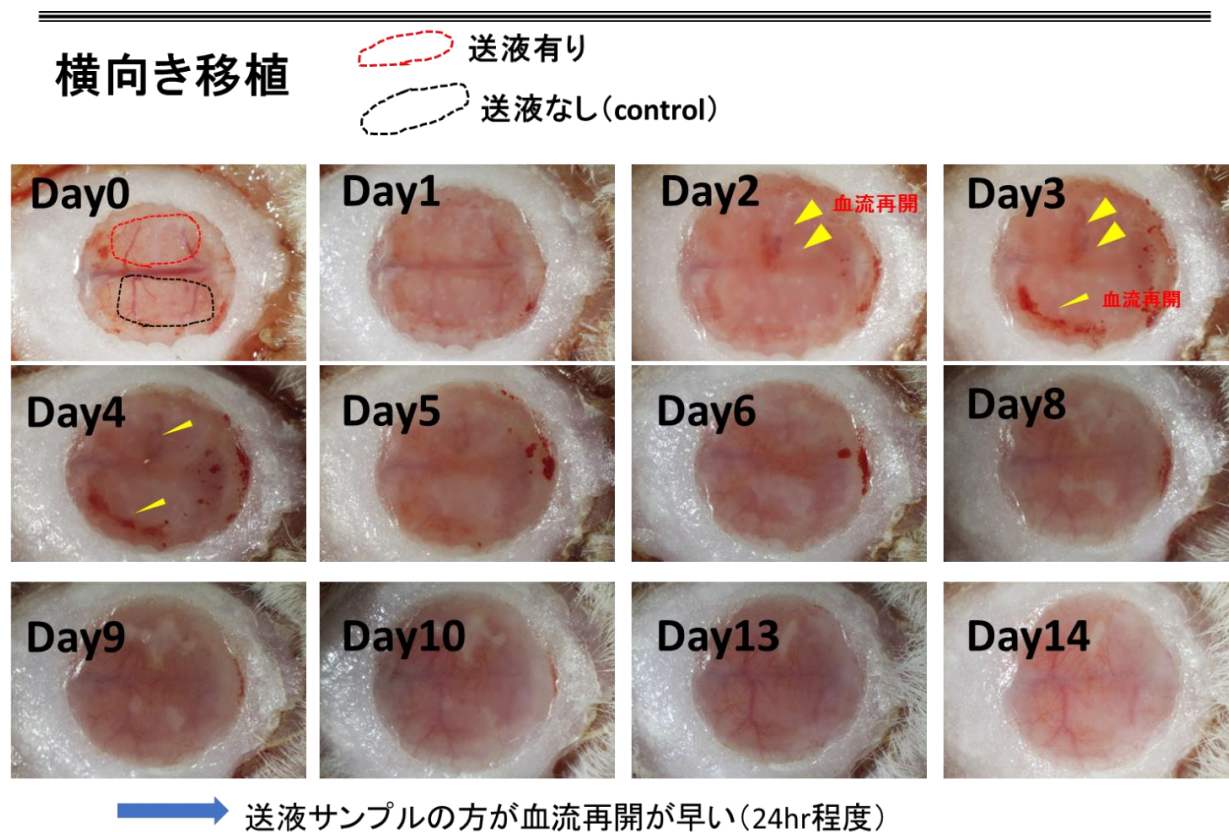


Figure 5.14 位食編の横向き移植の様子

5.4 カニュレーションによる肝組織の移植と体外循環培養

5.4.1 はじめに

前節では、クラニアルウィンドウに iPS 細胞から誘導した肝組織を移植したところ、マウス体内でそれを培養できることを確認し、組織内への血液流入を確認した。一方で、送液可能な血管構造を備えているにもかかわらず、その血管構造への血液流入は限定的であり、この移植方法は適していないと改めて結論づけた。そこで、本節では、体内埋め込み型のデバイスを実際に用いて移植する前に、カニュレを用いたマウス血管との接続方法を確立し、マウス血管に繋いだまま体外循環を行った。このようにして、肝細胞と血管構造を含んだ人工肝臓デバイスが宿主動物と血液を介して接続できることを証明する。まず、体外循環をするために PDMS とガラスを用いて完全密封型のデバイスを作製した。ガラスと PDMS との接着は永久接着であるため、マウスやラットの血圧には十分耐えられる。更に、ガラスをマウスの皮膚に接着し、観察可能なデバイスにした。これにより、完全に体内に組み込んでしまっても、最低でも血液が流れているかどうかといった評価ができると考えている。

5.4.2 カニュレーション

本節では、セルカルチャーインサートを用いて pressure drop を作り出し栓節で作製した血管構造の中に実際に蛍光ビーズが流れるか、つまり、実際に貫通された血管構造を作製できたかを評価する。1 つめは、血管を引き出す場所と戻す場所が異なり、門脈と肝静脈もしくは下大静脈を繋ぎ、肝臓をバイパスさせるタイプである。これには、シングルーメンのカテーテルを 2 箇所接続する必要がある、難易度が高いが、血圧の制御がしやすいという利点がある。

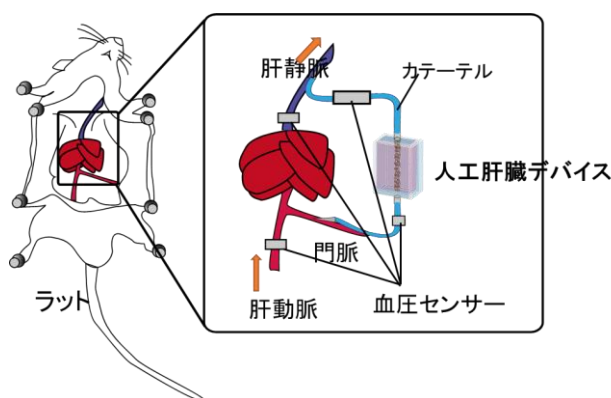


Figure 5.15 肝臓をバイパスするようなカニュレーション方法①

2 つは、血液を引き出す場所と戻す場所が同じ方法である。これは、頸動脈や、大腿静脈などの箇所ダブルルーメンカテーテルを接続し、そこから血液をとり、デバイスを通らせ、同じ場所に戻すやり方である。これは、吻合箇所を一つにできるメリットがあるが、血圧の変動によって、デバイスの中に血液が入っていない状態が生まれる可能性がある。

3 つは、血液を引き出す場所と戻す場所が一緒であるが、ダブルルーメンカテーテルを使わずにそれぞれの血管にカニューレーションを行う。そして、元の門脈を完全に結紮し門脈血すべてが肝臓デバイスに流れこむようにする。この方法は、肝臓デバイスに門脈圧すべてがかかるため一分間に 0.5ml 程度の血液が流れこむとなる。これは、これまで *in vitro* で行ってきた送液速度に比べると大きな値であるが、これまでの検証で細胞間結合が生体のそれと比べても強固のものが作製できていることから、この程度の血圧、流速には十分に耐えられると考えた。

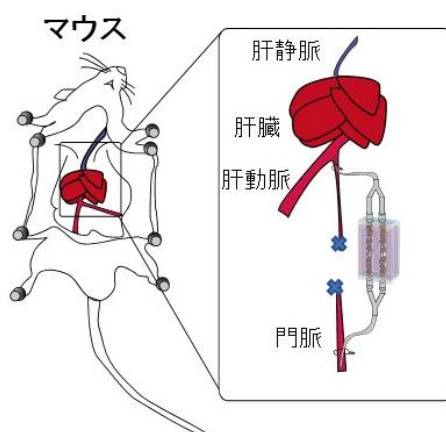


Figure 5.16 門脈を完全結紮しそこへカニューレーションを行う方法③

本研究では、移植のしやすさと血圧のコントロールの観点から③のカニューレーションの方法を採用し、ここに肝組織デバイスを接続することとした。

5.4.3 本節の目的

本節では、カニューレーション方法③を用いてマウスの血管に実際にカニューレーションを二箇所行うことにより、肝組織を吻合移植し、体外循環を行う。また、ヒト肝細胞を肝組織に加える事で、マウスの血液中からヒト幹細胞が分泌したアルブミン量を測定し、実際に肝組織がマウス体内で機能するかどうかを検証した。

5.4.4 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)
- ・イソフルラン麻酔器
- ・術具一式
- ・Leica 凍結切片作製装置

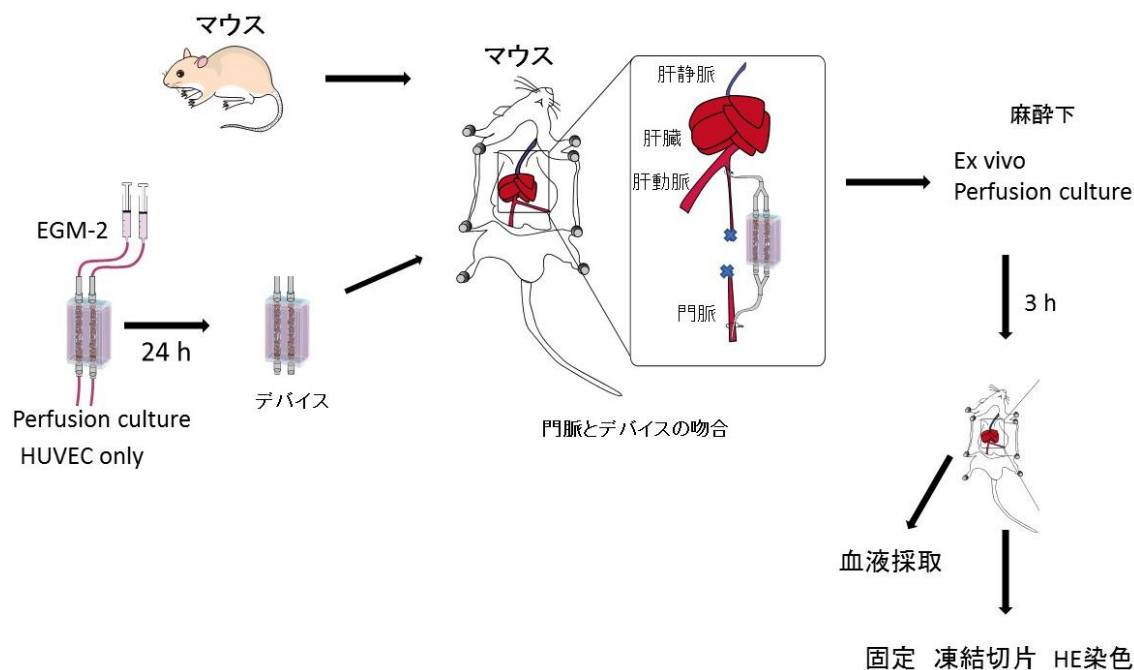


Figure 5.17 マウスへの肝組織移植と体外循環後のスキーム

【試薬】

- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・ RFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 : Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地 : Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・ Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ ウシ血清アルブミン : BSA, Sigma.
- ・ GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・ IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)
- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地 : Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・ Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ ウシ血清アルブミン : BSA, Sigma.
- ・ BD falcon Culture cell insert, (Pore size: 0.4 μm or 8 μm)
- ・ GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・ カニユーラ(0.5 mm type)×2
- ・ サーフロフラッシュ 27G, 24G
- ・ スクロース Wako 純薬
- ・ OCT コンパウンド, Tissue Tek
- ・ 27G シリンジ針 (テルモ)
- ・ ヘパリンコートヘマトクリット毛細管(Hirschmann laboratory)
- ・ ヘパリン Na 5000U/5ml(持田製薬)

- ・Fuji DRI-chem(Fujifilm)
- ・DRI-CHEM 用スライド

ALB

GPT/ALT

GOT/AST

LDH

GLU

【実験手順】

マウスの開腹

体重測定及び一般症状観察を実施後、8-9 週齢のマウスに吸気麻酔(イソフルラン 2-2.5% 流量：400-500 mL/min)で全身麻酔をかける。イソジン液及び 70%エタノール液を用いて腹部を消毒する。腹部及び頸部背側皮膚を切開後、腹部筋層を正中切開し、門脈を剥離露出する。

カニューレション

ハサミで門脈を半切するか、サーフロフラッシュを直接門脈に接続し、門脈にアクセスポートを作製する。半切部位にカテーテルを 2 本挿入し、カテーテルと血管を手術糸で結び、カテーテルが抜けないように固定する。予め用意しておいたバイオ人工肝組織デバイスをカテーテル出口へと接合し、チューブを皮下に通す。その後、門脈は結紮する。

デバイスの固定

バイオ人工肝臓デバイスを背面皮下に固定する。

マウスの縫合

腹部筋層を針付き縫合糸で縫合する。続いて、腹部及び頸部背側皮膚を縫合する。麻酔をとり、術後の体重と様子を観察する。

【採血と血液分析】

マウスの採血

マウス尾静脈に 29G のシリンジ針を挿入し、ヘマトクリット管で採血を行う。

ドライケムによる血液分析

採血した全血を遠心分離を行い、血漿を抽出する。その後、ドライケムを用いて血液分析を行う。

ELISA によるアルブミン量の測定

血漿内のアルブミン量を ELISA を用いて測定する。

【組織学的解析】

凍結組織の作製

体外循環を終えた肝組織をチャンバーから取り外し、凍結切片を作製する。取り出したハイドログ

ルを 10%,20% 30%スクロース液に 2 時間ずつ浸し、ハイドロゲルに含まれる水分をスクロースへと置換させる。その後、OCT コンパウンドでゲル全体を包埋し、液体窒素で速やかに冷却し凍結させる。

凍結切片の作製

凍結組織をマイクロトームを用いて作製するこの時組織の厚さは、10 μ m 程度とした。

凍結切片の染色

スライドガラスに転写された凍結切片を HE 染色または、免疫染色を持ちいて染色する。この時血管構造を可視化するために VE-Cadherin を染色した。

5.4.5 実験結果と考察

Fig. 5.18 にカニューレを用いた肝組織移植の模式図を示す。体外循環に用いるデバイスはガラスと PDMS で構成されており組織内の血管構造を用意に観察することができる。移植前の血管構造の様子を **Fig. 5.19** に示す。このように長さが約 10 mm 程度の 2 本の並列した血管構造をゲル内に構築した。カテーテルを接続するとすぐに、作製した血管構造に血液が流れこむことが確認できた (**Fig. 5.20**)。また 2 本の血管構造の間以外にもゲルとチャンバーの隙間にも流れこむ様子が確認されたがそれ以上血液が進入することはなかった。血管吻合後 3 時間まで血管の様子を観察したが、灌流培養 1 時間後は、血液が無駄に漏れだすことなく血管構造中を流れ、3 時間後にも血液がゲルへ漏れだすことはなく、血管内皮細胞のバリア機能が発揮されていた。これは以前行った実験(デキストランの送液実験や ZO-1 の染色)と一致する結果となった。また、途中で、血管構造内に血栓が生成され、血液が凝固し送液が止まってしまうことはなかった。これは、流路内腔を血管内皮細胞で覆っていたためであると考えている。

吻合後 3 時間後に組織を取り出した凍結切片を作製 H&E 染色した結果が **Fig. 5.21,22** である。凍結切片後の管腔構造の内壁には血管内皮細胞が接着している様子が観察できた。門脈に流れ込む血液量から計算すると、血管構造中には 200 μ L/min の血液が流れこむと予想される。これは、これまでの送液速度の 4-20 倍であるが、それでも血管内皮細胞が剥がれることはないことが確認できた。しかし一方で、マウス門脈は非常に小さく、血液量が非常に少ないのも事実である。

次に、血管構造を作製した上でハイドロゲル内に肝スフェロイドを充填し肝組織を作製した。その後、肝組織を同様にしてマウスの門脈経由で血管と吻合し移植を行った。その後、デバイスを皮膚に埋め込んだ上で、経過観察を行った。その結果、ハイドロゲルに血管内皮細胞を入れた場合と入れなかった場合には送液可能な血管構造間への血液の拡散に大きな違いが見られた(**Fig. 5.25**)。移植後 12 時間と 24 時間後に血液を採取し、マウス血液中に分泌されたヒトアルブミンの濃度を測定したところ、移植前はアルブミンが検出されなかったが 12 時間後には、アルブミンが検出され、24 時間後にはその濃度は上昇した。このことから、移植した肝組織とマウスの血管構造は確かに接続され、移植した肝組織内のヒト肝スフェロイドが分泌したアルブミンがマウス血液へと溶け出していた。つまり、これら移植方法は有用であり、作製した肝組織が肝疾患への治療に適用できる可能性を示すことができた。

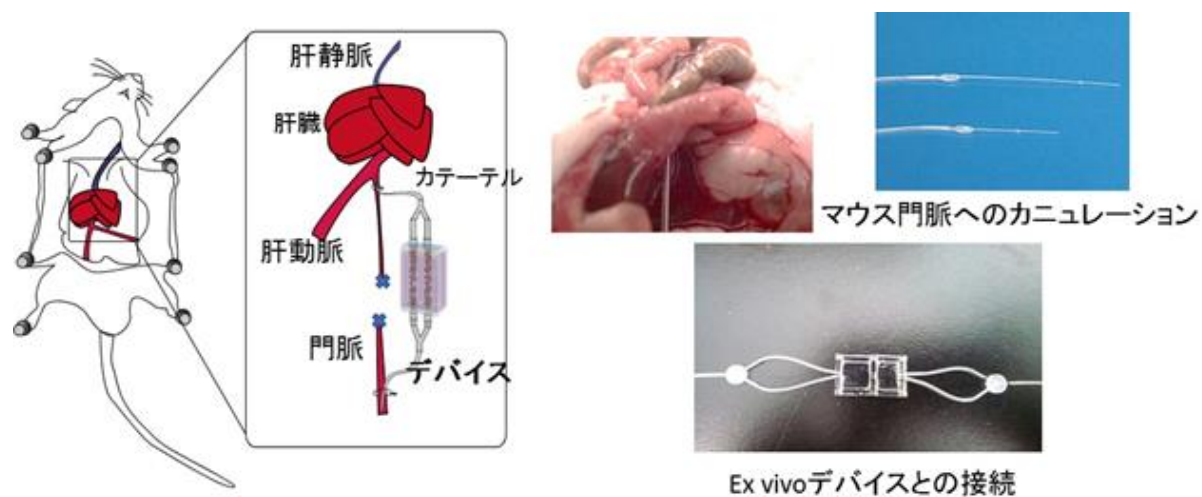


Figure 5.18 (左)カニュレーションを用いた肝組織の接続と、(右)実際に用いたカニュレーラとマウスへ接続した体外循環 PDMS デバイス

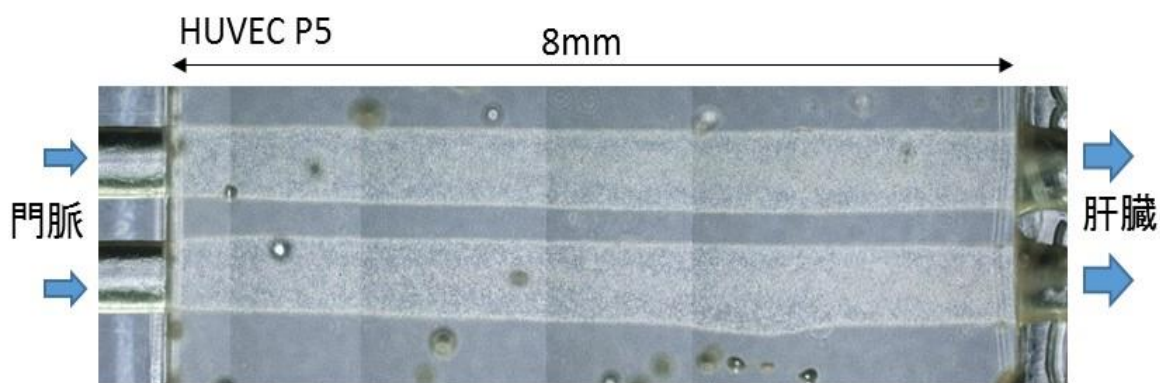


Figure 5.19 移植する前の血管構造とハイドロゲル（肝細胞とハイドロゲル内の血管内皮細胞なし）

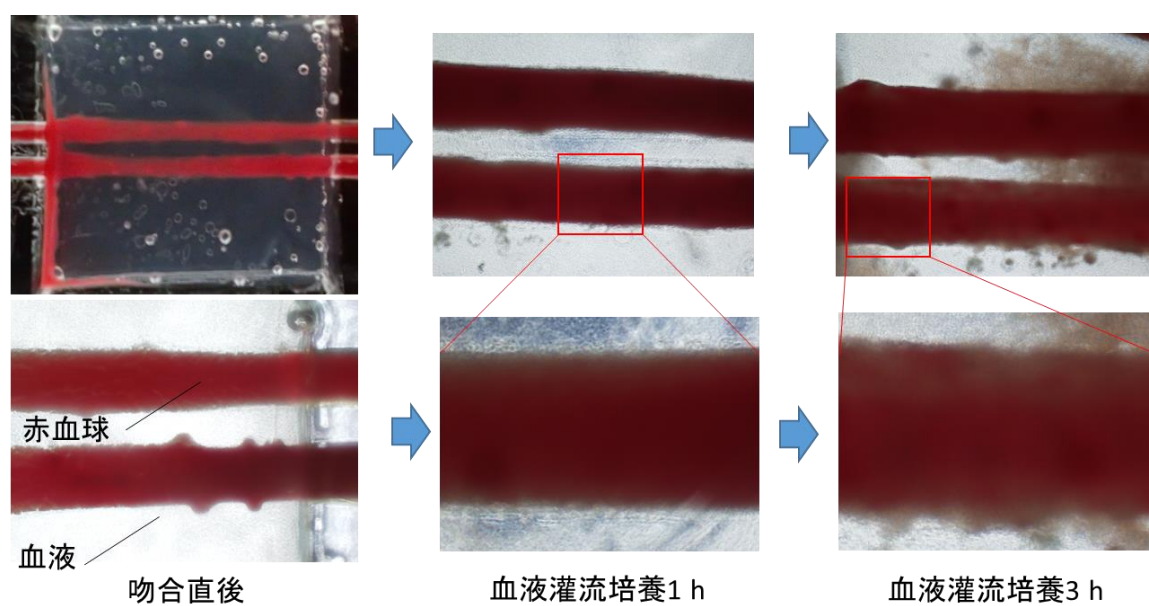


Figure 5.20 マウスカニキュレーションの血管構造の様子と血管構造への血液流入

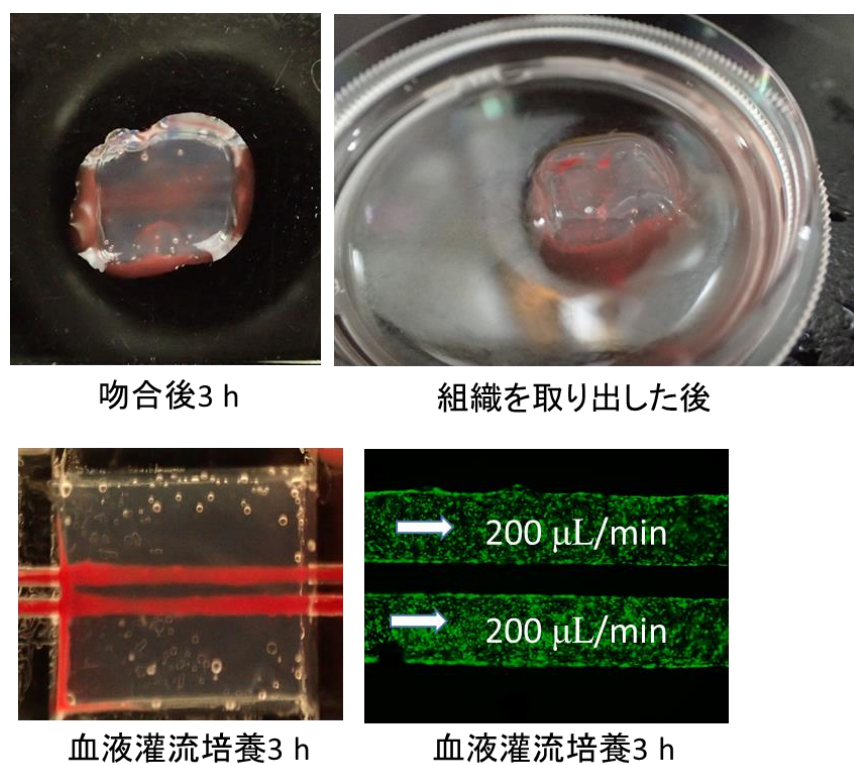


Figure 5.21 体外循環 3 時間後の移植組織と血管構造の様子

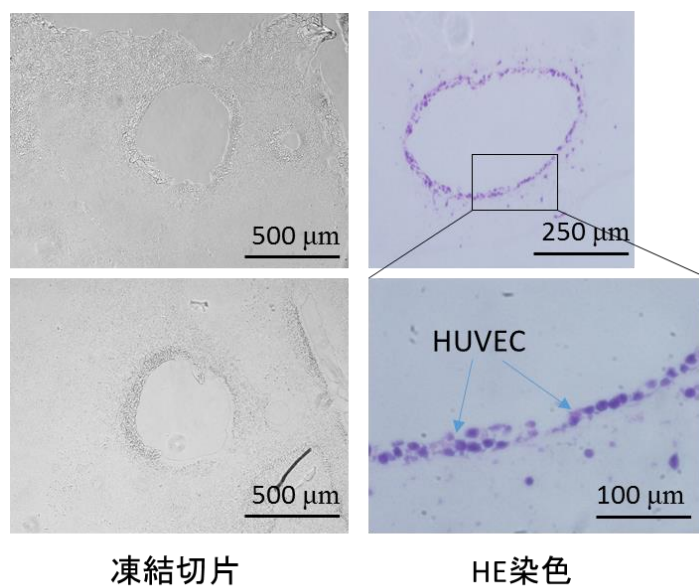


Figure 5.22 移植組織の血管構造の H&E 染色像

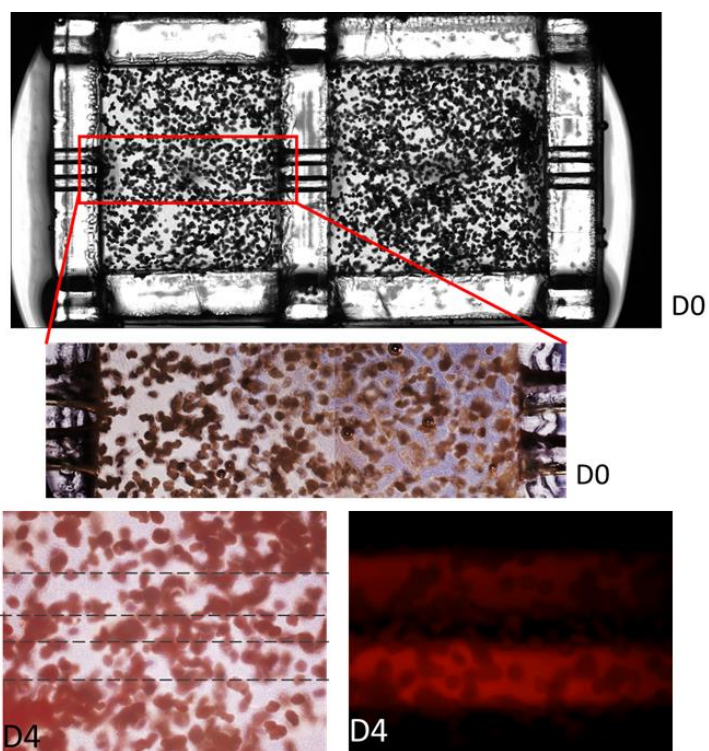
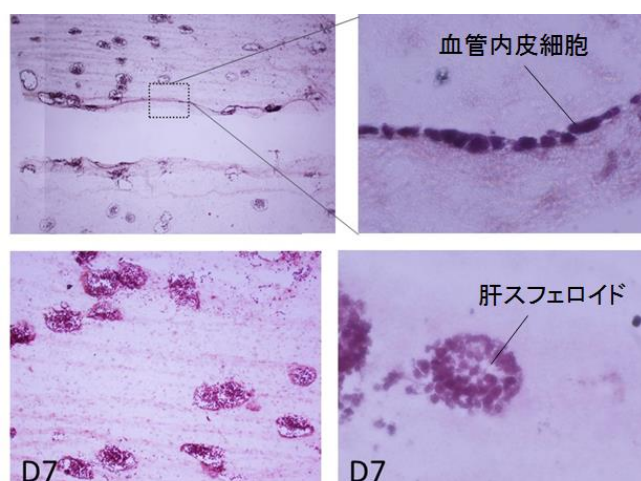


Figure 5.23 移植前の HepG2 を用いた高密度肝組織（ハイドロゲル内に HepG2 スフェロイドを包埋、血管内皮細胞と間葉系幹細胞なし）



移植後の肝組織のHE染色

Figure 5.24 体外循環 3 時間後の肝組織

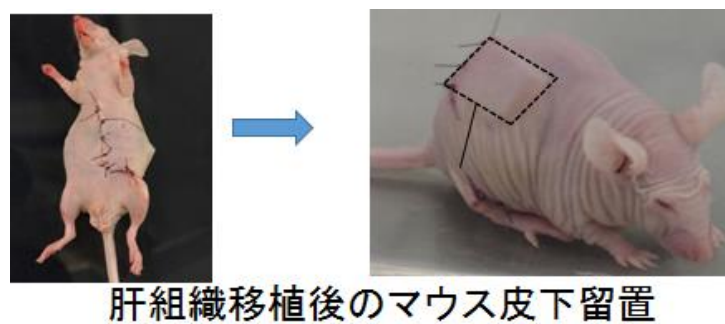


Figure 5.25 肝組織カニューレーション移植後のマウスと、皮下留置

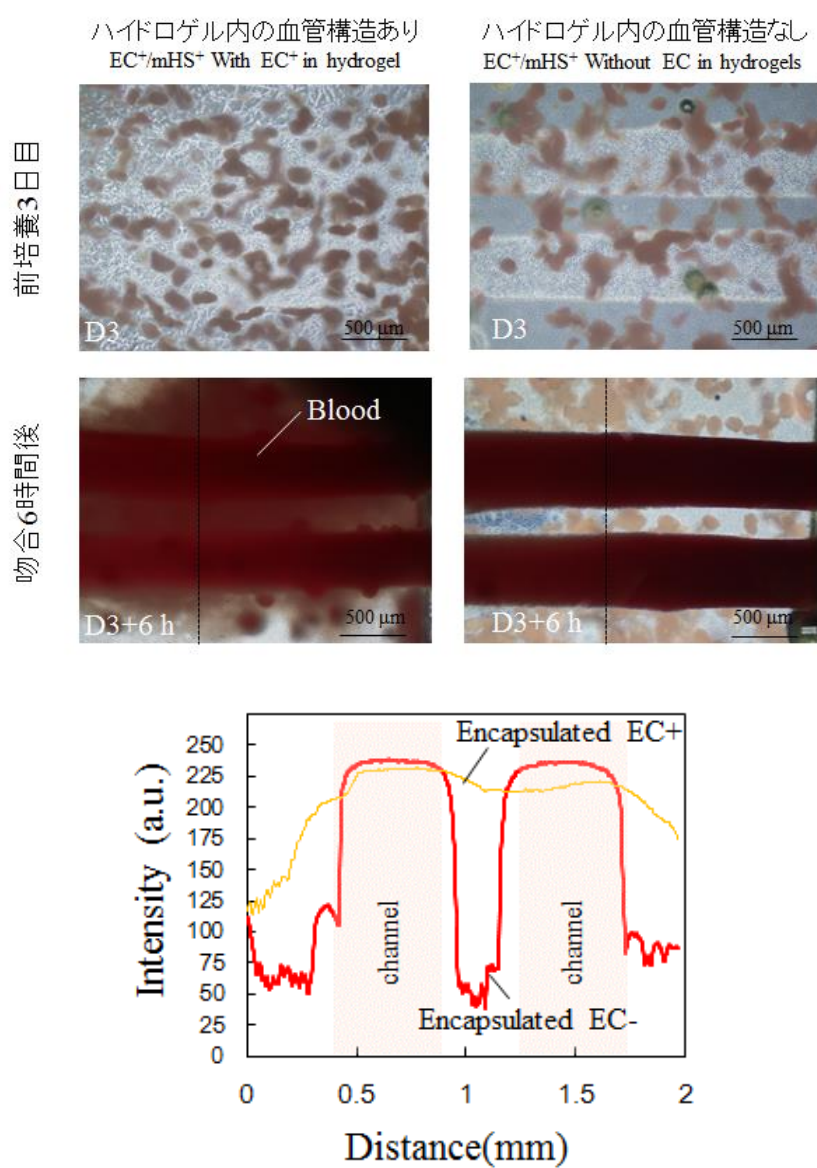


Figure 5.26 肝組織の移植と微小血管構造を通った血液の拡散

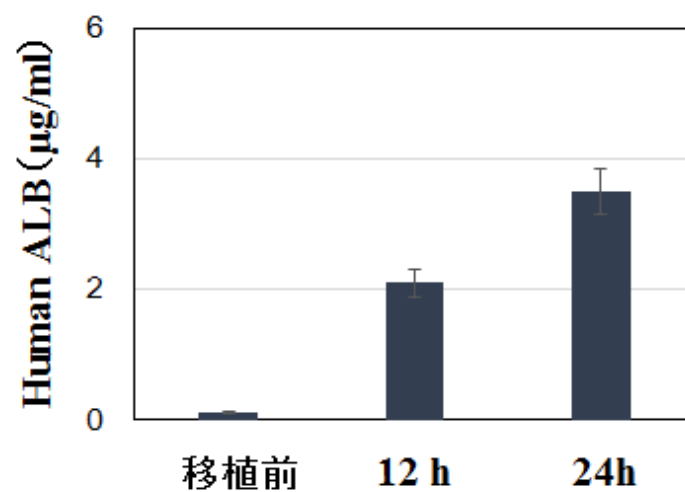


Figure 5.27 マウス血液中のヒト肝スフェロイドから分泌されたヒトアルブミンの濃度変化

5.5 マウス肝細胞の抽出

5.5.1 はじめに

前章では、つまり、ハイドロゲル内部にできた血管構造の管腔構造には強制的に培養液を送りこむどころか、液的につながっていない。これは、ハイドロゲルの上面、もしくは下面に血管内皮細胞のモノレイヤーを作製することで、入り口と出口ができ内部の血管ネットワーク構造と接続させることでこの問題を解消できる。本研究では前章で作製した血管ネットワークが全体的に接続し、更に入り口と出口がある血管ネットワークができるかどうかを評価する。評価の手法はセルカルチャーインサートを用いて液量差を作りし、圧力をかけることで、培地中に見濁した蛍光ビーズが血管ネットワーク内に進入するかどうかを評価する[7]。

5.5.2 本節の目的

本節の目的は、マウス肝細胞を単離培養し、その細胞を用いて肝スフェロイドを作製することである。

5.5.3 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (Carl zeiss LSM700)
- ・イソフルラン麻酔器
- ・術具一式

【試薬】

- ・ICR:CD1 マウス 7-8 週齢
- ・イソフルラン麻酔
- ・コラゲナーゼ
- ・トリプシンインヒビターWako 純薬
- ・ゼラチンコートディッシュ
- ・サーフロフラッシュ 27G
- ・オペ道具一式
- ・スフェロイド形成プレート

試薬	培地組成
DMEM基本粉末培地	13.5 g/L
Copper($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.1 μM
Selenium(H_2SeO_3)	3 $\mu\text{g/L}$
Zinc($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	50 pM
Penicillin	58.8 mg/L
Streptomycin	100 mg/L
Proline	60 mg/L
Insulin	10 mg/L
Linoleic acid	5 mg/L
Hydrocortison	7.5 mg/L
EGF	50 $\mu\text{g/L}$
NaHCO_3	1.05 g/L
HEPES	1.19 g/L

Table 5.1

試薬	前灌流用緩衝液[g/L]	コラゲナーゼ溶液[g/L]
NaCl	8	8
KCl	0.4	0.4
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.078	0.078
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0.151	0.151
HEPES	2.38	2.38
EGTA	0.19	-
NaHCO_3	0.35	0.35
CaCl_2	-	0.56
Glucose	0.9	-
Penicillin	0.059	0.059
Streptomycin	0.1	0.1
Collagenase	-	0.5
Trypsin inhibitor	-	0.05

Table 5.2

【実験手順】**手術の準備**

器具をオートクレーブから取り出し、すぐにクリーンベンチに入れて冷やす。調整した試薬と蒸留水を恒温水槽で 37℃に温める。解剖台・術具の準備。解剖台にマウスを固定するためのひもをセットし、術具はエタノールをいれた容器に入れておく。オペ直前に、ビーカー、ガラスシャーレ、ステンレスメッシュ、メスを冷蔵庫で 4℃に冷やしておく。

マウス門脈へのコラゲナーゼ灌流と肝臓の摘出

ICR マウスにイソフルラン呼気麻酔で眠らせる。マウスを解剖台に固定し、はさみで腹部を横に切り、次に縦に切っていく。門脈の周りの膜を取り除き、露出させた後に、下に糸を通して軽く結んでおく。門脈に 27G サーフロフラッシュを用いてカニューレーションを行う。門脈に針が刺さったら外側のカテーテル部分だけを中に入れ糸で固定したら、中の針だけ抜き取り、前灌流液を流す。IVC を切断し、圧力を抜く。前灌流液を流束最大で流す。1 度ポンプを止め、シリコンチューブをコラゲナーゼ溶液 (100U/ml) のびんにいれて流す。10 分ほど流し、肝臓が溶け、肝小葉が見え出したら、肝臓を切り出しシャーレに入れる。

マウス肝細胞の分離

シャーレに培地を 15 ml ぐらい多めに入れ摘出した肝臓をメスで切り刻み細胞膜を破壊し肝細胞を培地に溶かし出す。肝臓重さ(1.22g)ガーゼとステンレスメッシュの順で培地を塗るように加えながら濾過し二本の容器に同じぐらいの量に分ける。400 rpm 180 秒遠心分離する。上ずみをポンプで吸引して捨てたら培地を足し 40ml ぐらいにしたらやさしくピペッティングしておく。上記操作を二回繰り返す。再び同じく遠心分離器にかけ上ずみを捨て最後は一本にまとめて遠心分離器にかける。細胞カウントと生存率を測定する (Table 5.3)。Total number of viable cells: 8.6×10^7 cells/liver cell viability: 81.9%

マウス肝細胞を用いたスフェロイドの形成

生存率を求め終わったら、冷蔵庫で保管していた細胞を、 2.5×10^6 cells/well でコラーゲンコート播種し、37℃のインキュベーターに入れて培養する。同時に kuraray spheroid 形成プレートに 2.0×10^6 cells/well の濃度で細胞を播種し、スフェロイドを形成、培地サンプルを一日ごとに回収する。

	#1	#2	#3	From paper
Total number of viable cells/ liver	8.6×10^7 cells	8.1×10^7 cells	9.3×10^7 cells	9.2×10^7 cells
Cell viability	89.1%	91.8%	87.1%	

Table 5.3 一匹のマウスから採取できる肝細胞数と生存率

5.5.4 実験結果と考察

上記の手順によって ICR マウスから肝細胞を単離した(**Fig. 5.28**)。切り取った肝臓の重さは約 1.2-1.4 g, Total number of viable cells: 8.6×10^7 cells/liver であり細胞生存率は 87-92%であった。これは他論文と比較しても同等の値であった[8]。この肝細胞をコラーゲンコートディッシュ上で培養した結果を **Fig. 5.28** に示す。更に、スフェロイドを形成させたところ培養から 3 日ほどで直径が 200-400 μm のスフェロイドを形成することができた **Fig. 5.29**。培養 4 日目に生死染色を行ったところ、スフェロイドはすべて生細胞で構成されており、死細胞は観察できなかった。したがって、マウス肝細胞の単離の手技やスフェロイドの形成手順が有用であることを確認できた。この時のサンプルのアンモニア濃度の変化が **Fig. 5.30** である。期待通り、スフェロイド培養の方が単層培養に比べてアンモニア除去の能力が高まりそれが長期間続いた。今後マウスに対して治療効果を証明する際には、このように抽出したマウス肝細胞と血管内皮細胞、間葉系幹細胞を用いて立体的な肝組織を作製していく。

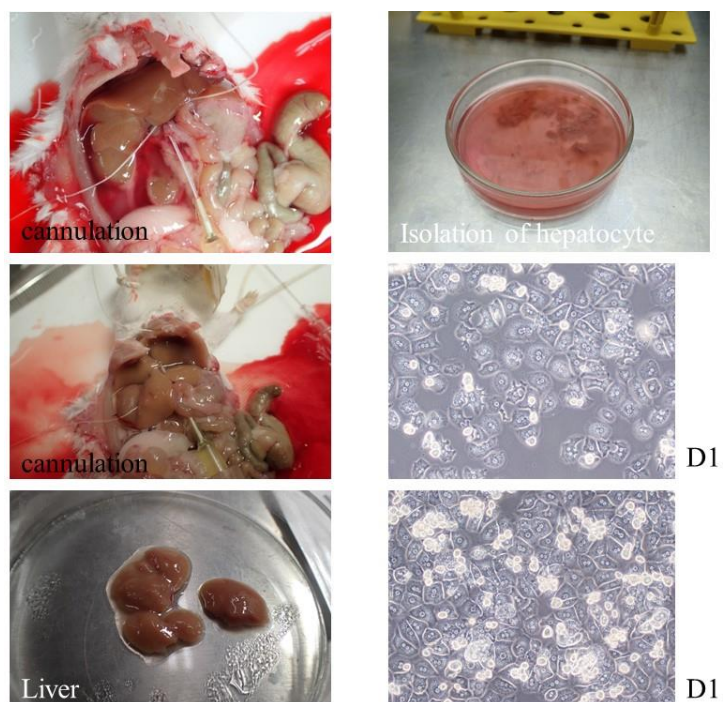


Figure 5.28 マウス肝細胞の単離と、単層培養

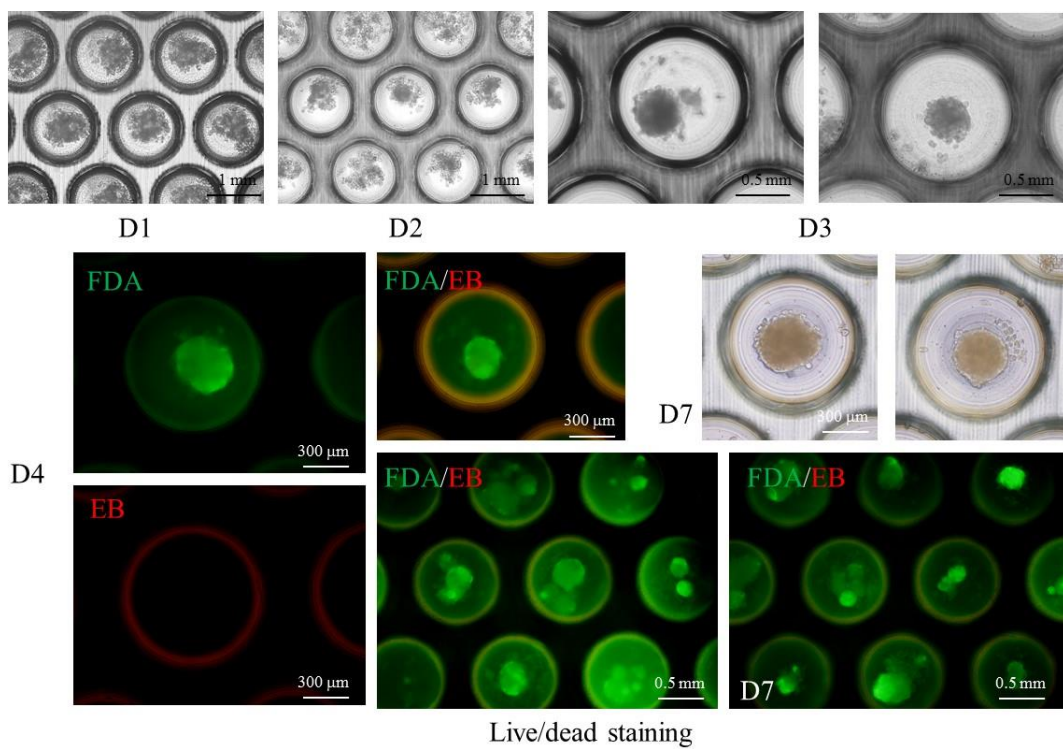


Figure 5.29 初代マウス肝細胞を用いて作製したスフェロイドと生死染色

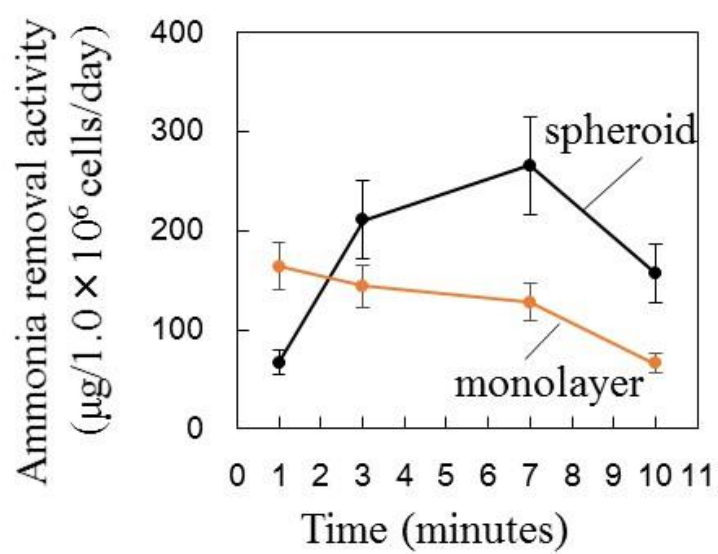


Figure 5.30 マウス肝細胞スフェロイドのアルブミン分泌速度(スフェロイド vs 単層培養)

5.6 肝組織の腹膜内留置

5.6.1 はじめに

これまでの節で、作製した立体的な肝組織を実際にマウスの血管と接続し、体外循環もしくは皮下に移植することによって

5.6.2 本節の目的

本節では、作製した立体的な肝組織を長期間マウスに作用させるために、第2節で作製した生体適合性の高いPDMS-PTFEチャンバーを用いて肝組織を作製し、それをマウス体内へ留置できるかどうかを検討した。更に、移植後のチャンバー内の血管構造を観察するためにこれら組織を移植した。

5.6.3 実験手順

【装置】

- ・位相差蛍光顕微鏡：IX-71, Olympus.
- ・UV 照射装置 SpotCure SP-9
- ・共焦点顕微鏡 (zeiss LSM700)

【試薬】

- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・RFP-ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), Angioprotemie.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・IWAKI ガラスボトムディッシュ(Glass 27 φ)
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC), Lonza
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・Mesenchymal stem cell(間葉系幹細胞)
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・BD falcon Culture cell insert, (Pore size: 0.4 μm or 8 μm)
- ・GelMa (Sigma, Gelma 5%, P.I 0.1%)
- ・カニューラ(0.5 mm type)×2
- ・サーフロフラッシュ 27G, 24G
- ・スクロース Wako 純薬
- ・OCT コンパウンド, Tissue Tek
- ・27G シリンジ針 (テルモ)
- ・ヘパリンコートヘマトクリット毛細管(Hirschmann laboratory)

- ・ヘパリン Na 5000U/5ml(持田製薬)
- ・Fuji DRI-chem(Fujifilm)
- ・DRI-CHEM 用スライド

ALB

GPT/ALT

GOT/AST

LDH

GLU

【実験手順】

チャンバーの作製

丸く切り抜いた PTFE のリングと共に PDMS でチャンバーを作製する。PTFE にタップを立てネジで切込みを入れる。ネジ部分に PP 製のコネクタを接続しシリコンチューブと接続を行う。

9本の血管構造の構築

予め用意しておいた HUVEC が接着した 9 本のニードルをチャンバーに加え逆側からゲルを入れる電極を差し込み、電気化学細胞転写により血管内皮細胞をハイドロゲルに転写する。逆側からもコネクタを差し込みシリコンチューブに接続する。

血管構造の前培養

シリンジポンプを接続し、灌流培養を行う。

マウスの開腹

体重測定及び一般症状観察を実施後、8-9 週齢のマウスに吸気麻酔(イソフルラン 2-2.5% 流量 : 400-500 mL/min)で全身麻酔をかける。イソジン液及び 70%エタノール液を用いて腹部を消毒する。腹部及び頸部背側皮膚を切開後、腹部筋層を正中切開する

マウスへの腹腔内留置

デバイスをマウス腹腔内へと留置する。今回の実験では血管構造を接続せず、腹部へ留置するのみとした。

マウスの縫合

腹部筋層を針付き縫合糸で縫合する。続いて、腹部及び頸部背側皮膚を縫合する。麻酔をとき、術後の体重と様子を観察する。

μCT 撮影

移植から 1 週間たったところで再度マウスに麻酔をかけ μCT 撮影を行った。

5.6.4 実験結果と考察

灌流培養を 3 日間行った後、チャンバーをマウス腹腔へと移植した。サイズのことはマウス腹部へぎ

りぎり収まるサイズであった(**Fig. 5.31**)。移植から一週間後に、 μ CT でマウス腹部に留置したチャンバーを観察した。このようにマウス飼育下でも X 線を用いれば、マウス体内を観察できることがわかった。この間、3週間程マウス体内にチャンバーを留置したが、大きな体重変化は見られず、体内に大きな炎症や拒絶反応は見られなかったと考えられる(**Fig. 5.32**)。今後は、腹部に留置した後、マウス門脈へカニューレーションを行い。造影剤をマウス血管に注入することによって *in vivo* でイメージングを行う予定である。

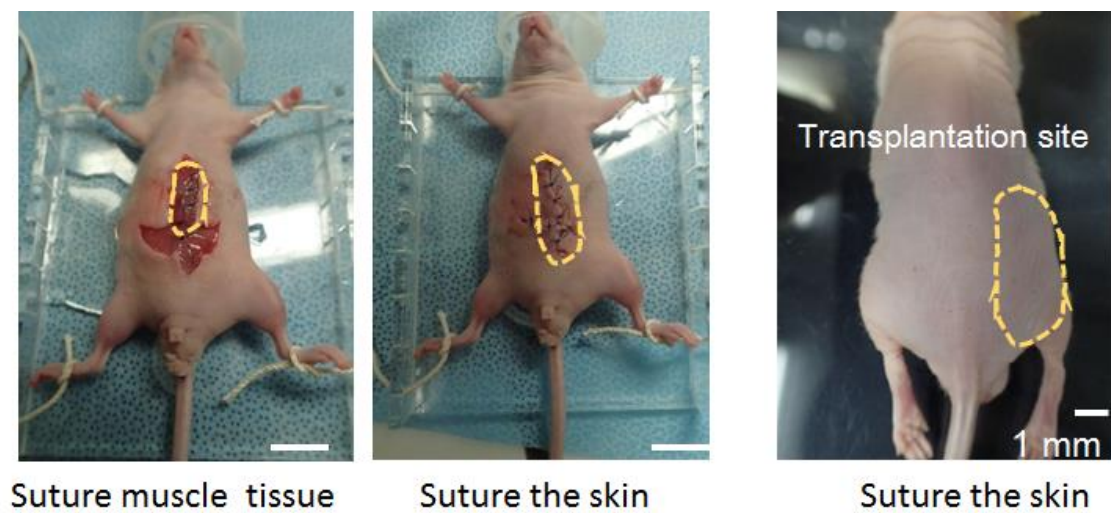


Figure 5.31 マウスへの腹腔留置

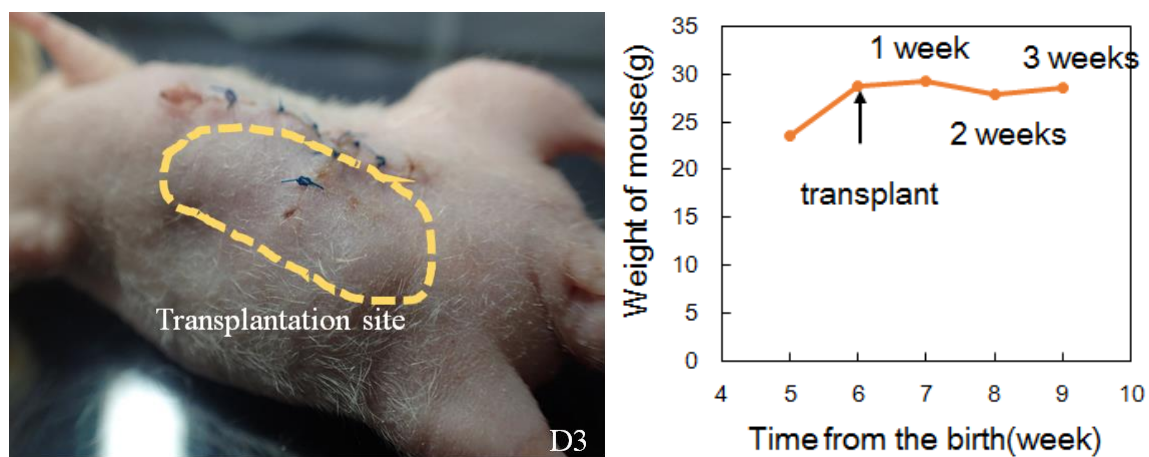


Figure 5.32 マウス腹腔留置と体重変化

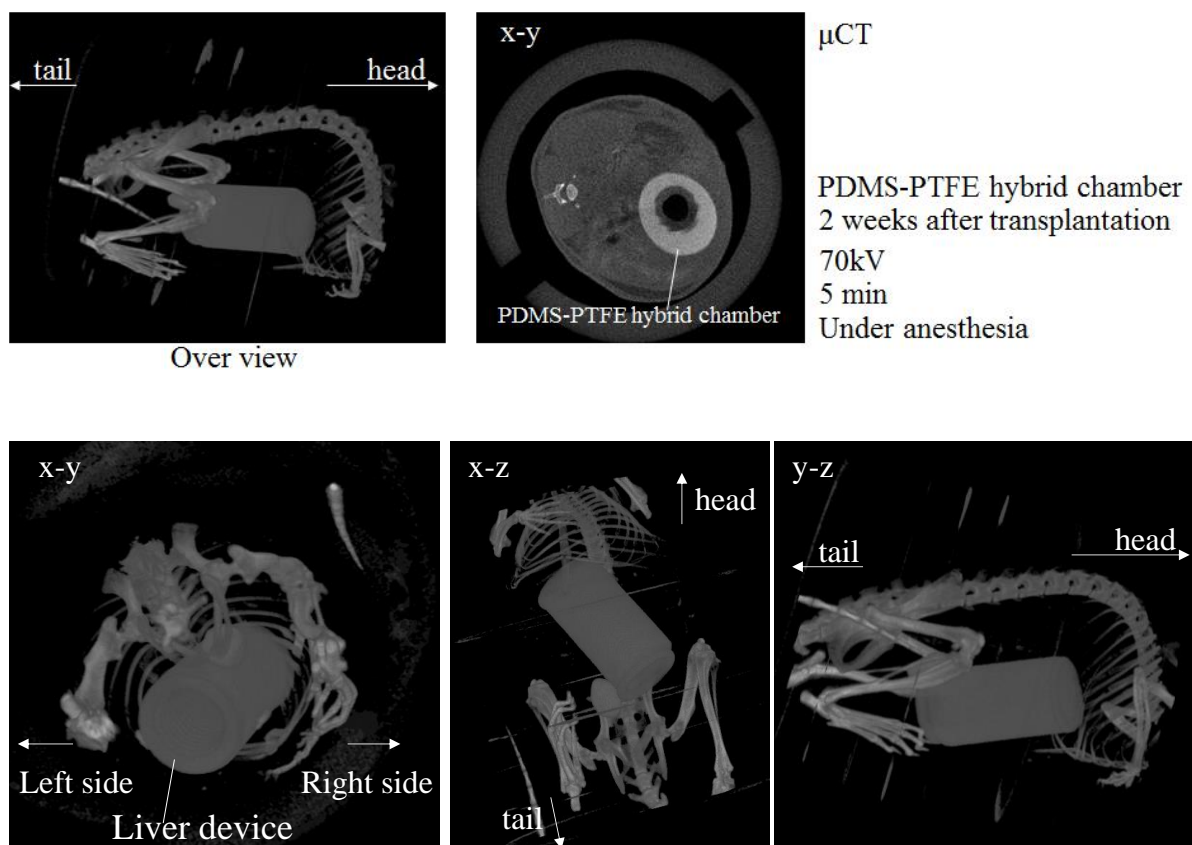


Figure 5.33 共焦点顕微鏡によるゲル内の血管内皮細胞の血管ネットワークとコネクションエリア(D3)

5.7 本章のまとめ

本章では、4章までに作製してきた肝組織を、実際にマウスに移植することによって、肝疾患治療に有用であるかを評価した。まず、肝組織をクラニアルウィンドウに移植し、組織内に血管構造が侵入することを確認した。一方で、送液可能な血管構造に流れ込むには時間がかかるため、これまで作製してきた血管構造を有効に活用できていないと判断した。そこで、マウスを開胸し、マウス門脈とデバイスを直接接続し、吻合移植する移植することを発想した。これにより、すみやかに組織内に血液が流れ込み、作製した肝組織に酸素が供給できることを確認した。また、デバイスを皮下に埋め込むことによって短期間であれば、マウスの体内へと留置することも可能であることを証明した。更に、ヒト肝細胞をデバイスに充填し、移植したところマウス血液からヒトアルブミンが検出された。このことから、本論文を通して作製していた血管構造を備えた肝組織が、マウス体内において機能することを確認した。以上、本研究で作製した血管構造を備えた立体的な肝組織と酸素に注目した設計論が、組織工学的な肝疾患治療に応用できることを示した。

5.8 参考文献

- [1] Rattier BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine. *Journal of Clinical Engineering*. 1997;22:26.
- [2] Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, Kimura M, Koike H, Ueno Y, et al. Vascularized and Complex Organ Buds from Diverse Tissues via Mesenchymal Cell-Driven Condensation. *Cell Stem Cell*. 2015;16:556-65.
- [3] Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013;499:481-4.
- [4] Yuan F, Salehi HA, Boucher Y, Vasthare US, Tuma RF, Jain RK. Vascular Permeability and Microcirculation of Gliomas and Mammary Carcinomas Transplanted in Rat and Mouse Cranial Windows. *Cancer Research*. 1994;54:4564-8.
- [5] Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, et al. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat Protoc*. 2014;9:396-409.
- [6] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95:4607-12.
- [7] Moya ML, Hsu Y-H, Lee AP, Hughes CCW, George SC. In Vitro Perfused Human Capillary Networks. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2013;19:730-7.
- [8] Klaunig J, Goldblatt P, Hinton D, Lipsky M, Chacko J, Trump B. Mouse liver cell culture. *In Vitro*. 1981;17:913-25.

第六章

結論

6.1 本研究の結論

本研究では、生体外で厚みのある肝臓組織を作製するために、短時間で組織内部に分岐型の血管組織を構築する技術の確立を目的とした。これを達成するために、本研究ではオリゴペプチドの電気化学的な還元脱離反応を用いて、迅速かつ非侵襲的に細胞を脱離させる技術を確立し、それを円柱状のニードルに適用することで、5分以内にマイクロ流路構造に血管内皮細胞を転写する技術を確立する。そして、iPS細胞由来の肝細胞を組織内に高密度で充填することで、血管構造を備えた立体的な肝臓組織の構築を研究の目的とした。

第1章では、従来の臓器移植や人工臓器に代わる新しい治療法としての再生医療について、その社会的意義と注目される組織工学的アプローチについて述べた。このアプローチでは、生体足場材料を利用し、皮膚や骨などの生体内でも比較的単純な組織が構築可能となってきたものの、組織特有の特性や複雑な三次元構造のために、心筋や肝臓、その他多くの組織や臓器の構築が困難である状況を示した。また、2次元組織と3次元組織の違いについて考察した後、3次元組織を生体外で作製するためのポイントと血管構造の重要性について述べた。一方で、3次元組織作製の試み自体は行われており、既往研究例として挙げた。既往研究から現場の問題点を整理し、これらを克服する新規技術の開発を本研究の目的として明示した。

第2章では、本章では電気化学を用いた血管構造の作製方法を述べた。その際作製に用いるオリゴペプチドの設計利点を説明し光架橋性ゼラチンゲルの作製方法とその特性を述べた。そして最後に、これらの要素を組み合わせ、電気化学的に細胞脱離させ、血管構造を作製する方法を示した。更に、作製した血管構造の評価を細胞の配向性、ギャップジャンクション、タイトジャンクション、細胞極性の4つの観点から検証し、それぞれの機能を持つことを示した。以上の結果から、三次元的な組織を作製するのに必要不可欠な血管構造を短時間で作製する手法を確立した。また、その血管構造は生体と同等の機能を持っており、移植組織としては十分な機能を持っている血管構造と結論づけた。

第3章では、電気化学を用いた血管構造の作製方法だけでは不十分であった微細な毛細血管に当たる血管構造の作製手法について記載した。まず、光架橋性ゼラチンゲル内にどのような条件で血管ネットワークが誘導できるかの検討を行った。その結果、血管内皮細胞は継代数が4もしくは5の細胞を 2.0×10^6 cells/ml 間葉系の幹細胞を 1.0×10^5 cells/ml の濃度で濃度5%の GelMa に作製する条件が最も適していた。また、セルカルチャーインサートインサートを用いた実験では、ハイドロゲルの周りにモノレイヤーを形成させることで、内部の血管ネットワークと外部の培地エリアが接続させることを確認し、実際に培地に懸濁した蛍光ビーズが血管ネットワーク内に侵入している様子を共焦点顕微鏡で観察した。最後に、この知見を活かし、前章で確立した電気化学的に血管構造を作製する手法と

組み合わせ、送液可能な血管構造と、組織の隅々まで酸素を運ぶ微小な血管ネットワークを兼ね備えた複雑分岐血管構造をハイドロゲル内に作製した。この微小な血管ネットワークへは隣り合うチャンネルに圧力差を付与して送液することで、血管間を横切るような液流れが発生し、微小血管構造内にビーズが流れるのを確認した。

第4章では、肝組織作製のための肝スフェロイドの形成について検討した。その後、iPS細胞から肝細胞へと誘導し、それを用いたスフェロイド作製を行った。更に、このスフェロイドを用いて前章の電気化学的な血管構造作製手法と組み合わせ、立体的な肝組織を作製した。その結果、アルブミン分泌量とアンモニア代謝を行うiPS細胞由来の肝組織を構築した。

第5章では、これまでに作製してきた肝組織を、実際にマウスに移植することによって、肝疾患治療に有用であるかを評価した。まず、肝組織をクラニアルウィンドウに移植し、組織内に血管構造が侵入することを確認した。一方で、送液可能な血管構造に流れ込むには時間がかかるため、これまで作製してきた血管構造を有効に活用できていないと判断した。そこで、マウスを開胸し、マウス門脈とデバイスを直接接続し、吻合移植する移植することを発想した。これにより、すみやかに組織内に血液が流れ込み、作製した肝組織に酸素が供給できることを確認した。また、デバイスを皮下に埋め込むことによって短期間であれば、マウスの体内へと留置することも可能であることを証明した。更に、ヒト肝細胞をデバイスに充填し、移植したところマウス血液からヒトアルブミンが検出された。このことから、本論文を通して作製していた血管構造を備えた肝組織が、マウス体内において機能することを確認した。

以上、本研究で作製した血管構造を備えた立体的な肝組織と酸素に注目した設計論が、組織工学的な肝疾患治療に応用できることを示した。また、微小な血管構造を短時間で組織に組み込む技術は、肝臓だけではなく腎臓や脾臓などの三次元的な組織の構築の基盤技術となることを示す事が出来たと考えている。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々にご協力を頂きました。ここに深く感謝いたします。

指導教員の筑波大学数理物質科学研究科物性・分子工学専攻、鈴木博章教授におかれましては、研究アイデアの考え方から、論文の書き方を含めたプレゼンテーション技術、海外出張の仕方まで、研究室生活全てにおいて懇切丁寧なご指導を賜りました。これまで沢山のご迷惑をお掛けし未だ至らない点が多い私ですが、学問・精神両面ともに鍛えて頂き、研究室に入った五年前と比べて様々な点で成長できたと感じております。心より感謝申し上げます。

また、横浜国立大学工学研究院、福田淳二准教授におかれましては、論文執筆をはじめ、実験技術、細胞工学に関する基礎知識などをお教えいただき、また、研究全般に関する疑問に日常的に答えて頂くなど、多くのご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

筑波大学数理物質科学研究科物性・分子工学専攻、横川雅俊助教におかれましては、生化学に関する基礎知識から、学位審査用の発表スライド作成まで、多くのご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

また、経済面で支えて下さった日本学術振興会には深く感謝いたします。

また、研究全般において協力いただいた筑波大学、鈴木研究室の方々、横浜国立大学、福田研究室の方々、苦しいときでも互いに励まし合い、有意義な時間を共に過ごした仲間感謝します。

最後に、研究に専念できる生活環境を与え、温かく見守ってくれた家族、友人、恋人に心から感謝します。

2016 年 2 月

大崎 達哉

研究業績一覧

公表論文

- [1] **T.Osaki**, T. Kakegawa, T. Kageyama, J. Enomoto, T. Nittami and J. Fukuda, Acceleration of vascular sprouting from fabricated perfusable vascular-like structures, *PLoS ONE* (IF=3.534), 10(4) DOI:10.1371/journal.pone.0123735, 2015.
- [2] T. Kageyama, T. Kakegawa, **T. Osaki**, J. Enomoto, T. Ito, T. Nittami and J. Fukuda, Rapid engineering of endothelial cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels, *Biofabrication* (IF=3.7), IOP science, 6, 2, 025006, 2013
- [3] J. Fukuda, S. Takahashi, **T. Osaki**, N.Mochizuki and H. Suzuki, Processing of nanolitre liquid plugs for microfluidic cell-based assays, *Sci. Technol. Adv. Master*(IF=2.613), 13 2012
- [4] N. Sadr , M. Zhu, **T. Osaki**, T. Kakegawa, Yunzhi Yang, M. Moretti, J. Fukuda⁶, A. Khademhosseini⁷, SAM-based cell transfer to photopatterned hydrogels for microengineering vascular-like structures, *Biomaterials* (IF=8.312), 32, pp7479-90, 2011
- [5] N.Mochizuki, T. Kakegawa, **T. Osaki**, N. Sadr, N.N. Kachouie, H. Suzuki, J. Fukuda, Tissue engineering based on electrochemical desorption of an RGD-containing oligopeptide, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* (IF=4.4), 10.1002/term.519, 2011.
(Proceedings paper)
- [6] **Tatsuya Osaki**, Takahiro Kakegawa, Hiroaki Suzuki, and Junji Fukuda, Electrical Detachment of Cells for Engineering Capillary-like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel, *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, pp. 2451-4, 2011.
- [7] **Tatsuya Osaki**, Takahiro Kakegawa Naoto Mochizuki, Junji Fukuda, " Fabrication of perfusable vasculatures by using micromolding and electrochemical cell transfer ", *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, pp. 6655-6658, 2013.

学会発表

[国際学会]

- [1] ○**Tatsuya Osaki**, Takanori Takebe, Junji Fukuda, Micro-Molding of Vascularized Liver-Like Tissues with iPS-Derived Hepatic Endoderm Spheroids, Materials research society(MRS) fall meeting 2014, Boston, U.S.A., 2014.(受賞あり)
- [2] ○**Tatsuya Osaki**, Takanori Takebe, Junji Fukuda, Fabrication of vascularized liver-like tissues using human iPS-derived hepatic endoderm cells and electrochemical cell transfer, Termis-AP 2014, Daegu, Korea, 2014.

- [3] ○ **Tatsuya Osaki**, Junji Fukuda, Engineering hepatic tissues with perfusable vascular structures, WC9 alternatives and animal use experiment 2014, Prague, Czech Republic, 2014. (ポスター)
- [4] ○ **Tatsuya Osaki**, Takanori Takebe, Junji Fukuda, Micro-molding of vascularized liver-like tissues with iPS-derived hepatic endoderm spheroids, JST ERATO International Symposium on 3D Tissue fabrication, Tokyo, Japan, 2013. (ポスター)
- [5] ○ **Tatsuya Osaki**, Takahiro Kakegawa, Junji Fukuda, Rapid assembly of perfusable microvascular-like structures by electrochemical cell transfer, Termis-America 2013, Atlanta, U.S.A, 2013.
- [6] ○ **Tatsuya Osaki**, J. Fukuda, Fabrication of perfusable vasculatures using micromolding and electrochemical cell transfer, IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 2013, Osaka, Japan, July, 2013.
- [7] ○ **Tatsuya Osaki**, Hiroaki Suzuki, Junji Fukuda, Rapid assembly of vascular-like structures by electrochemical cell transfer, Biofabrication 2012, Manchester, UK, October, 2012
- [8] ○ **Tatsuya Osaki**, T. Kakegawa, H. Suzuki and J. Fukuda ,Electrical Cell Transfer for Engineering Capillary-Like Structures in Photocrosslinkable Hydrogels, TERMIS-AP Meeting SYIS-AP Young Investigator Awards ,Singapore, August, 2011. (Award nominate) (受賞あり)
- [9] ○ **Tatsuya Osaki**, Takahiro Kakegawa, Hiroaki Suzuki, Junji Fukuda, Electrical Detachment of Cells for Engineering Capillary-Like Structures in a Photocrosslinkable Hydrogel, IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Boston, USA, September, 2011

[国内学会]

(口頭発表)

- (1) 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二 「電気化学細胞脱離と光架橋性ハイドロゲルを用いた血管網構築」 化学工学会第 77 回年会、2012、3 月 工学院大学
- (2) 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二「電気化学を用いた血管用構造の高速バイオアセンブリ」第 64 回生物工学会、2012 年、10 月、神戸
- (3) 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二 「電気化学細胞脱離を用いた血管様構造の構築」 生物工学会若手会シンポジウム、2013、7 月 宮崎シーガイア

(ポスター発表)

- (1) 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二 「光架橋性ハイドロゲルを用いた血管網構造の構築」 化学工学会つくば化学技術懇話会、2011、3 月
- (2) 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二 「光架橋性ハイドロゲルを用いた血管網構築の試み」 化学工学会第 43 回秋季大会、2011、9 月 名古屋工業大学
- (3) 大崎達哉、鈴木博章、福田淳二 「電気化学的手法を用いた血管様構造のアセンブリ」 第 3 回バイオ

アセンブラ公開シンポジウム、2012、7月 京都大学

- (4) 大崎達哉、武部貴則、福田淳二 「電気化学細胞脱離技術を用いた肝臓類似構造の構築」第66回、生物工学会、2014、9月、札幌国際会議場
- (5) 大崎達哉、武部貴則、福田淳二「電気化学的細胞脱離を用いた3D肝臓類似組織の構築」第82回電気化学学会大会、2015、3月、横浜国立大学
- (6) 大崎達哉、中山真梨子、末吉正和、嶋津祐香、福田淳二 「血管構造を備えた肝臓類似組織の構築」第14回再生医療学会総会、2015年3月、パシフィコ横浜

[執筆]

- [1] 大崎達哉、福田淳二、”電気化学を用いた細胞脱離技術”、動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術、技術情報協会、2014.
- [2] 大崎達哉、福田淳二、”電気化学を用いた細胞操作”、三次元ティッシュエンジニアリング、pp129-134、2014.
- [3] 大崎達哉、福田淳二、”血管構造のモールドイングによる肝組織形成”、三次元ティッシュエンジニアリング pp273-278、2014.
- [4] 大崎達哉、福田淳二、武部貴則、”ヒト iPS 細胞を用いた複雑臓器の成形加工と移植医療への応用”、実験医学、5月号、2014.

[受賞]

- (1) **Termis-AP, SYIS-AP Young Investigator Awards nominate 4th place ,Singapore, August, 2011**
- (2) 第64回生物工学会大会、セルプロセッシング計測評価研究部会 2012年度優秀発表賞、2012年10月
- (3) 筑波大学大学院大学院、数理物質科学研究科長賞 2013年3月
- (4) **Best Poster Prize of Biomaterials Science, Materials research society (MRS) fall meeting, , Boston USA, December, 2014**
- (5) 第82回電気化学学会、優秀ポスター発表賞 2015年3月